

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dora Peršić

Razvoj metode HPLC za određivanje
serotonina, dopamina i noradrenalina u tkivu
mozga štakora

Diplomski rad

Zagreb, 2017

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za neurofiziologiju Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Sofije Ane Blažević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Najljepše se zahvaljujem doc. dr. sc. Sofiji Ani Blažević, izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec, dr. sc. Saši Likiću, prof. dr. sc. Dubravki Hranilović i Mariji Potočić na svim savjetima te pomoći u izradi i pisanju ovog diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

RAZVOJ METODE HPLC ZA ODREĐIVANJE SEROTONINA, DOPAMINA I NORADRENALINA U TKIVU MOZGA ŠTAKORA

Dora Peršić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Serotonin, dopamin i noradrenalin neurotransmiteri su s mnogim funkcijama u mozgu. Promjene u njihovom metabolizmu povezane su s neurorazvojnim poremećajima, što određivanje njihovih razina čini ključnim za razumijevanje tih poremećaja. Analitička metoda koja se često koristi u tu svrhu je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl.* high-performance liquid chromatography, HPLC). Za analizu traženih spojeva potrebno je razviti metodu, a razvijenu metodu zatim treba validirati. U ovom diplomskom radu, razvila sam brzu metodu HPLC s UV detekcijom za određivanje koncentracija serotonina, dopamina i noradrenalina u tkivu mozga štakora. Razvijenu metodu validirala sam određivši njenu selektivnost, linearnost i ponovljivost za svaki analit. Rezultati validacije pokazali su dobru selektivnost za sve analite. Linearnost i ponovljivost bile su dobre za serotonin, dok za dopamin i noradrenalin nisu bile u potpunosti zadovoljavajuće, vjerojatno uslijed njihove oksidativne degradacije. U usporedbi koncentracija određenih razvijenom metodom s onima dobivenim komercijalnom metodom ELISA nisam ustanovila korelaciju, stoga rezultati upućuju na potrebu za pronalaskom boljeg načina pripreme i pohrane uzoraka.

(68 stranica, 27 slika, 14 tablica, 55 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: HPLC-UV, serotonin, dopamin, noradrenalin, ELISA, mozak

Voditelj: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec; izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Rad prihvaćen: 04. 05. 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University in Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

DEVELOPMENT OF A HPLC METHOD FOR SEROTONIN, DOPAMINE AND NORADRENALINE DETECTION IN RAT BRAIN TISSUE

Dora Peršić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb

Serotonin, dopamine and noradrenaline are neurotransmitters with many functions in the brain. Changes in their metabolism have been implicated in various neurodevelopmental disorders, making determination of their levels necessary for a better understanding of those disorders. An analytical method often used for this purpose is high-performance liquid chromatography (HPLC). In this study, I have developed a rapid HPLC method with UV detection for serotonin, dopamine and noradrenaline determination in rat brain tissue. I have validated the developed method by analyzing its selectivity, linearity and repeatability. The method showed good selectivity for all three neurotransmitters. Linearity and repeatability were good for serotonin, while they were not completely satisfactory for dopamine and noradrenaline, presumably due to their oxidative degradation. Comparison of serotonin, dopamine and noradrenaline levels determined by the developed method with those obtained by a commercially available ELISA method did not show any correlation, indicating a need for further improvement of sample preparation and storage.

(68 pages, 27 figures, 14 tables, 55 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: HPLC-UV, serotonin, dopamine, noradrenaline, ELISA, brain

Supervisor: Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof; Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 04.05.2017.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Principi rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.....	1
1.2. Komponente HPLC sustava	2
1.2.1. Pumpa	3
1.2.2. Kolona	4
1.2.3. Detektor	4
1.2.3.1. UV-VIS detektor	4
1.3. Identifikacija i kvantifikacija analita metodom HPLC	5
1.3.1. Identifikacija analita	5
1.3.2. Kvantifikacija analita u uzorku.....	5
1.3.2.1. Metoda vanjskog standarda.....	5
1.3.2.2. Metoda unutarnjeg standarda	6
1.4. Razvoj i validacija metode HPLC	6
1.4.1. Odabir početnih uvjeta.....	6
1.4.2. Optimizacija uvjeta metode	7
1.4.3. Validacija metode	7
1.5. Serotonin i katekolamini	8
1.5.1. Serotonin.....	8
1.5.1.1. Biokemija i metabolizam serotonina	8
1.5.1.2. Središnji odjeljak serotonina.....	10
1.5.1.3. Periferni odjeljak serotonina	11
1.5.2. Katekolamini	11
1.5.2.1. Dopamin.....	14
1.5.2.2. Noradrenalin	16
1.6. Metode mjerenja razina serotonina i katekolamina u biološkim uzorcima.....	17
1.6.1. HPLC u određivanju serotonina i katekolamina u biološkim uzorcima.....	17
1.6.2. ELISA u određivanju serotonina i katekolamina u biološkim uzorcima.....	19
2. Cilj.....	20

3. Materijali i metode.....	21
3.1. Materijali	21
3.1.1. Uzorci tkiva mozga.....	21
3.1.2. Kemikalije	21
3.1.3. Tehnička pomagala i pribor	22
3.2. Metode.....	24
3.2.1. Izolacija uzoraka prefrontalne kore	24
3.2.2. Priprema uzoraka - homogenizacija uzoraka prefrontalne kore i ekstrakcija monoamina	24
3.2.3. Mjere prevencije za očuvanje kromatografske kolone	25
3.2.4. Priprema standardnih otopina.....	26
3.2.5. Identifikacija pikova koji pripadaju serotoninu, dopaminu i noradrenalinu na kromatogramu dobivenom analizom uzorka tkiva mozga	27
3.2.6. Razvoj metode HPLC	28
3.2.7. Validacija metode	29
3.2.7.1. Selektivnost.....	29
3.2.7.2. Linearnost	29
3.2.7.3. Ponovljivost	30
3.2.8. Određivanje koncentracije serotonina, dopamina i noradrenalina u uzorcima mozga metodom HPLC	31
3.2.9. Određivanje koncentracije serotonina u uzorcima tkiva mozga metodom ELISA	32
3.2.10. Određivanje koncentracije dopamina i noradrenalina u uzorcima tkiva mozga metodom ELISA.....	34
3.2.11. Statistička obrada podataka	35
4. Rezultati	36
4.1. Utjecaj filtracije na razlučivost pikova.....	36
4.2. Razvoj metode.....	39
4.2.1. Izokratna metoda	39
4.2.2. Početna gradijentna metoda.....	40
4.3. Odabrana metoda.....	44
4.4. Identifikacija pikova na kromatogramu uzorka tkiva mozga.....	48
4.5. Validacija metode.....	52
4.5.1. Selektivnost	52

4.5.2. Linearnost	53
4.5.3. Ponovljivost	55
4.6. Koncentracije serotonina, dopamina i noradrenalina dobivene metodom HPLC i ELISA	55
4.7. Usporedba metoda HPLC i ELISA	56
5. Rasprava.....	58
5.1. Razvoj i validacija metode	58
5.2. Usporedba metoda HPLC i ELISA	60
6. Zaključak.....	63
7. Literatura.....	64
8. Životopis	68

Popis kratica

5HIAA	5-hidroksiindol-octena kiselina
5HT	5-hidroksitriptamin, serotonin
AAAD	dekarboksilaza aromatskih aminokiselina
COMT	katekol-o-metiltransferaza
DA	dopamin
DHBA	3,4-dihidroksibenzilamin
ELISA	<i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (<i>engl.</i> high-performance liquid chromatography)
HVA	homovanilična kiselina
MAO	monoamin oksidaza
MHPG	3-metoksi-4-hidroksifenilglikol
NA	noradrenalin
psi	<i>engl.</i> pounds per square
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TPH	triptofan hidroksilaza
TRP	triptofan
TYR	tirozin
UV	ultraljubičasto
VMA	vanililmandelična kiselina

1. Uvod

1.1. Principi rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl.* high-performance liquid chromatography, HPLC) metoda je koja se koristi u analitičke i preparativne svrhe. Kao i ostale kromatografske metode, temelji se na razdvajanju komponenata smjese kako bi se traženi analit mogao detektirati. Razdvajanje spojeva iz smjese vrši se na temelju njihove različite raspodjele između dviju faza - stacionarne i mobilne. Stacionarna faza nalazi se u koloni u obliku čestica između kojih prolazi mobilna faza. U odnosu na klasičnu tekućinsku kromatografiju, u metodi HPLC mobilna faza protječe kroz kolonu pod visokim tlakom, čime je skraćeno trajanje metode i znatno poboljšano razdvajanje komponenata smjese (Kromidas, 2006).

Razdvajanje spojeva ovisi o vrsti interakcija koje pojedini spoj stvara sa stacionarnom, odnosno, mobilnom fazom. Ako spoj stvara povoljnije interakcije sa stacionarnom nego s mobilnom fazom, dulje će se zadržati vezan na koloni, tj. imat će dulje retencijsko vrijeme. Spojevi koji su zbog svojih fizikalnih svojstava dobro topivi u mobilnoj fazi imaju kratko retencijsko vrijeme. Ovisno o svojstvima stacionarne i mobilne faze u koloni, razlikujemo nekoliko principa razdvajanja u tekućinskoj kromatografiji. Izbor principa razdvajanja ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima traženog analita, a odabir se vrši tako da spoj stvara povoljnije interakcije s mobilnom fazom i time brzo eluira (Gray i Lawrence, 2008).

U **kromatografiji normalne faze** stacionarna je faza polarna, a mobilna faza nepolarna. Stacionarna faza može biti silikagel ili aluminijev oksid, s vezanim hidroksilnim skupinama koje stvaraju polarne interakcije sa spojevima u smjesi. Kao mobilna faza obično se koristi jako nepolarno otapalo, poput heksana. Ovaj način razdvajanja dobar je izbor za lipofilne molekule koje nisu topive u vodenim otopinama.

Kao što joj i samo ime govori, **kromatografija reverzne faze** koristi obrnuti princip od kromatografije normalne faze, što znači da je stacionarna faza nepolarna, a mobilna faza polarna. Ovaj način razdvajanja prvi je izbor za odjeljivanje neioniziranih i neutralnih molekula topivih u vodi. Ovdje su na silanolne skupine čestica silikagela u stacionarnoj fazi kemijski vezani alkilni lanci, najčešće oktadecilalkil (C18) ili manje lipofilni oktilalkil (C8). Slobodne silanolne skupine

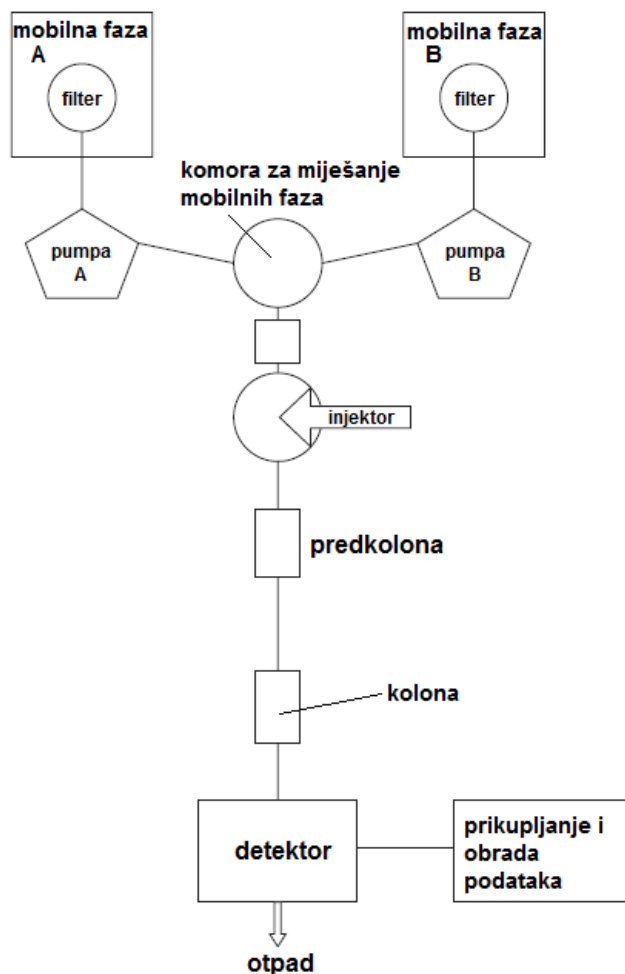
mogu stvarati interakcije sa spojevima, produžujući time njihovo retencijsko vrijeme, a rezultat su nesimetrični pikovi. Mobilna faza obično je na bazi vode, s dodanim slabim organskim otapalom koje se može miješati s vodom, poput acetonitrila ili metanola.

U **kromatografiji ionske izmjene**, spojevi stvaraju elektrostatske interakcije s nabijenim skupinama stacionarne faze, a eluiraju se promjenom pH.

Za razliku od ostalih opisanih načina razdvajanja, **kromatografija isključivanjem** razdvaja spojeve prema veličini. Pogodna je za odvajanje velikih molekula, koje ne mogu ući u pore čestica stacionarne faze, pa se stoga prve eluiraju (Skoog i sur., 2006).

1.2. Komponente HPLC sustava

Osnovne su komponente svakog HPLC sustava spremnik za mobilnu fazu, pumpa, injektor, kolona, detektor i sustav za obradu podataka. Mobilne faze korištene za HPLC moraju biti visoke čistoće (tzv. “HPLC grade”), a filteri kroz koje se dovode u sustav sprečavaju unos eventualnih nakupljenih nečistoća ili taloga soli u sustav. Iz mobilnih faza potrebno je i odstraniti mjehuriće zraka pomoću otplinjača, kako ne bi dospjeli u sustav i prekinuli protok mobilne faze. Poželjno je imati predkolonu, kako bi se zaštitila kolona i poboljšalo razdvajanje. Kolone se često održavaju termostatiranim kako bi se odstranio utjecaj temperature na varijabilnost rezultata. Prolaskom kroz kolonu, spojevi u mobilnoj fazi dopijevaju do detektora. Nakon prolaska kroz detektor, mobilna faza se odbacuje, a u preparativnoj kromatografiji mogu se skupljati frakcije koje sadrže spojeve od interesa. Shematski prikaz HPLC sustava dan je na Slici 1., a njegove najvažnije komponente opisane su u nastavku.



Slika 1. Shematski prikaz HPLC sustava. Prema Gray i Lawrence, 2008.

1.2.1. Pumpa

Pumpe korištene za HPLC sposobne su generirati protok između 0,1 - 10 ml/min i stvarati tlak do 6000 psi (*engl.* pounds per square inch), što odgovara tlaku od 400 bara. Ipak, većina metoda koristi protok između 0,3 - 2 ml/min, s tlakovima koji maksimalno dosežu 3000 psi. Za izokratnu eluciju, u kojoj je omjer polarne i organske komponente mobilne faze konstantan, dovoljno je imati jednu pumpu u sustavu. Pri analizi većeg broja spojeva iz uzorka obično je potrebno koristiti gradijentnu eluciju, tj. mijenjati udio organske faze tijekom trajanja metode, a za takav tip separacije nužno je imati dvije pumpe (Gray i Lawrence, 2008).

1.2.2. Kolona

Izbor kolone ovisi ponajprije o kemijskim svojstvima analita te broju analita koje se želi učinkovito odvojiti. Što je kolona dulja, njena efikasnost je veća i razdvajanje je bolje, ali zato se vrijeme analize produljuje i tlak u koloni raste. Stoga se kratke kolone koriste za brzu analizu malog broja spojeva, a dulje kolone potrebne su za učinkovito razdvajanje većeg broja analita (Snyder i sur., 1997). Tipične dimenzije kolona za HPLC leže u rasponu duljina od 100 - 250 mm i promjera od 2 - 4,6 mm. Promjer čestica stacionarne faze uglavnom je između 3 - 10 μm . Reverzna faza najčešće je korišten princip razdvajanja, a uglavnom se koriste kolone s C18 stacionarnom fazom (Gray i Lawrence, 2008).

1.2.3. Detektor

Princip detekcije može se temeljiti na samim svojstvima analita, poput UV apsorpcije, fluorescencije ili elektrokemijskih reakcija. U indirektnoj detekciji, mjeri se promjena nekog svojstva mobilne faze, poput vodljivosti, indeksa loma i raspršenja svjetla (Skoog i sur., 2006).

1.2.3.1. UV-VIS detektor

Detekcija spojeva pomoću ultraljubičastog (UV) detektora počiva na njihovoj sposobnosti apsorpcije ultraljubičastog dijela elektromagnetskog spektra. Signal detektora pritom ovisi o koncentraciji analita te njegovoj sposobnosti apsorpcije svjetlosti zadane valne duljine. Stoga iz usporedbe pikova dvaju analita nije moguće zaključiti koji je od njih prisutan u većoj koncentraciji, jer različita sposobnost apsorpcije UV svjetla tih tvari utječe na visinu dobivenog pika. Prednosti UV detektora su njegova pouzdanost i jednostavnost za korištenje, no u biološkim uzorcima postoje mnogobrojne endogene komponente koje apsorbiraju pri valnim duljinama između 190 i 220 nm, što otežava analizu onih spojeva koji imaju apsorpcijski maksimum u tom području ukoliko je njihova koncentracija u uzorku niska (Saunders i Venn, 2008). U tom slučaju, valja koristiti neki od drugih tipova detektora, poput fluorescentnog ili elektrokemijskog, a često se HPLC uparuje i s masenim spektrometrom kao detektorom.

1.3. Identifikacija i kvantifikacija analita metodom HPLC

1.3.1. Identifikacija analita

Jednostavna identifikacija traženog analita u smjesi temelji se na određivanju retencijskog vremena vanjskog standarda i traženju pika čije se retencijsko vrijeme poklapa s onim vanjskog standarda, pod uvjetom da su i vanjski standard i smjesa analizirani pri istim uvjetima. Ipak, ovakav način identifikacije nije u potpunosti pouzdan ako na kromatogramu analiziranog uzorka postoji više pikova oko očekivanog retencijskog vremena traženog analita, budući da faktori poput temperature utječu na varijabilnost u retencijskom vremenu (Skoog i sur., 2006). Kao potvrda da pik zaista odgovara traženom analitu, može se provesti metoda dodavanja vanjskog standarda u uzorak (*engl.* spiking). Pritom se prati kod kojeg pika je došlo do povećanja površine nakon dodavanja vanjskog standarda.

Identifikacija spoja moguća je i na temelju njegovih fizikalnih svojstava - maseni spektrometar uparen s kromatografskim sustavom detektira i identificira spojeve na temelju njihove strukture, a spojevi koji apsorbiraju u UV dijelu spektra mogu se identificirati na temelju svojih apsorpcijskih spektara (Skoog i sur., 2006).

1.3.2. Kvantifikacija analita u uzorku

1.3.2.1. Metoda vanjskog standarda

Kvantifikacija analita iz uzorka u metodi vanjskog standarda temelji se na izradi baždarnog pravca ovisnosti površine pika o koncentraciji vanjskog standarda. Iz kromatograma se zatim određuje površina pika analita te iz jednadžbe baždarnog pravca odredi njegova koncentracija. Da bi kvantifikacija bila pouzdana, metoda treba pokazivati dobru linearnost, a ispitivani analit mora se nalaziti unutar linearnog raspona ovisnosti površine pika o koncentraciji. Umjesto površine pika, može se koristiti i njegova visina, no to je manje pouzdan način budući da je i širina pika posljedica detektirane količine analita.

1.3.2.2. Metoda unutarnjeg standarda

U ovoj metodi kalibracije, otopinama vanjskih standarda i uzorku dodaje se poznata količina unutarnjeg standarda. Unutarnji standard spoj je koji strukturom mora biti vrlo sličan ispitivanom analitu, no ne smije biti prirodno prisutan u uzorku koji se analizira. Također, mora se dobro razdvajati od traženog analita. Unutarnji standard dodaje se u uzorak prije njegove pripreme za analizu. Kvantifikacija analita u ovoj metodi temelji se na izračunu faktora odziva (*engl. response factor*), koji je omjer površine pika analita u uzorku i površine pika unutarnjeg standarda. Iz ovisnosti faktora odziva o koncentraciji vanjskog standarda može se odrediti koncentracija traženog spoja. Metoda kalibracije pomoću unutarnjeg standarda preciznija je od one temeljene na vanjskom standardu zbog korekcije za količinu analita izgubljenu prilikom pripreme uzorka (Kuss, 2006).

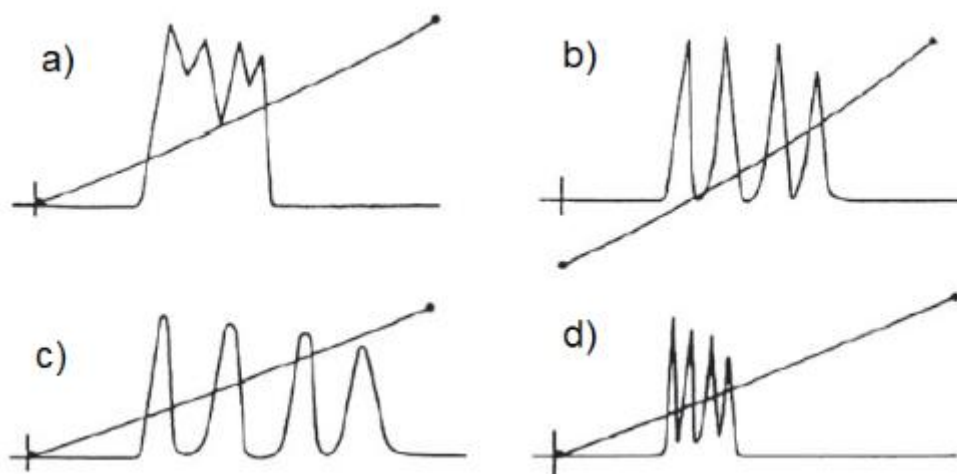
1.4. Razvoj i validacija metode HPLC

1.4.1. Odabir početnih uvjeta

U razvoju metode za analizu željenog uzorka, potrebno je prvo prikupiti informacije o kemijskim svojstvima analita. Polarnost molekule, vrste i broj funkcionalnih skupina, vrijednosti pKa i topivost, svojsva su molekule koja određuju njeno vezanje za stacionarnu fazu, odnosno, topivost u mobilnoj fazi, stoga će o njima ovisiti izbor vrste razdvajanja. Način detekcije analita također treba odabrati na temelju njegovih fizičkih i kemijskih svojstava. Primjerice, ukoliko analit pokazuje mogućnost apsorpcije UV svjetla, dobro je krenuti od korištenja UV detektora zbog njegove jednostavnosti i pristupačnosti. Zatim treba odabrati kalibracijsku metodu - ukoliko postoji spoj koji se može koristiti kao unutarnji standard za traženi analit, treba ga preferirati u odnosu na korištenje vanjskog standarda, zbog korekcije za dio analita koji je izgubljen prilikom pripreme uzorka. O vrsti uzorka ovisit će pak način ekstrakcije, a korisno je znati i raspon koncentracija traženog analita u uzorku. Pretraživanjem literature moguće je pronaći već razvijenu metodu za analizu traženog spoja iz uzorka koji imamo, no zbog razlika između kromatografskih kolona - čak i onih koje imaju iste dimenzije i tip stacionarne faze - uvjete metode svejedno je potrebno optimizirati za korištenu kolonu (Gray i Lawrence, 2008).

1.4.2. Optimizacija uvjeta metode

Optimizacija metode svodi se na postizanje bolje rezolucije pikova te njihovog razdvajanja u kraćem vremenu. Napredak optimizacije prati se u izgledu pikova - oštri i simetrični pikovi dobro odijeljeni od okolnih pikova znak su dobrog razdvajanja. Uvjeti metode čija optimizacija utječe na izgled i razlučivost pikova su pH mobilne faze, udio organskog otapala, nagib gradijenta, temperatura, te protok mobilne faze (Bakes, 2008). Primjeri koji pokazuju kako neki od navedenih uvjeta metode utječu na razdvajanje pikova prikazani su na Slici 2.



Slika 2. Primjeri kromatograma dobiveni b) smanjenjem udjela organske faze, c) smanjenjenjem nagiba gradijenta, d) povećanjem protoka. Kromatogram pod a) prikaz je razdvajanja prema početnim uvjetima. Preuzeto od Kromidas, 2006.

1.4.3. Validacija metode

Kako bi se metoda koja je pokazala dobro razdvajanje mogla pouzdano koristiti u svrhu kvantificiranja analita u uzorku, potrebno ju je validirati. Parametri koji se obično validiraju su linearnost, granica detekcije i kvantifikacije, specifičnost, selektivnost, preciznost. **Linearnost** metode određuje se izradom baždarnog pravca ovisnosti signala na detektoru o poznatim koncentracijama standarda, a iz nje se određuju i **granica detekcije** metode kao najmanja količina analita koja se može detektirati, te **granica kvantifikacije**, kao najveća koncentracija analita koja je još uvijek u rasponu linearnog odnosa signala na detektoru o koncentraciji.

Selektivnost je određena faktorom separacije susjednih pikova, a ilustrirana je udaljenošću između njihovih vrhova. **Ponovljivost** metode ispituje se određivanjem razlike u rezultatima analize iste smjese kroz nekoliko ispitivanja. **Točnost** metode odnosi se na slaganje između stvarne i izračunate koncentracije, a određuje se korištenjem unutarnjeg standarda. **Robustnost** je sposobnost metode da ostane nepromijenjena unatoč malim, ali namjernim promjenama u njenim parametrima. Za testiranje robustnosti mogu se, primjerice, mijenjati udio organske faze u manjim postotcima ili valna duljina apsorpcije na UV detektoru (Danaher i sur., 2000).

1.5. Serotonin i katekolamini

1.5.1. Serotonin

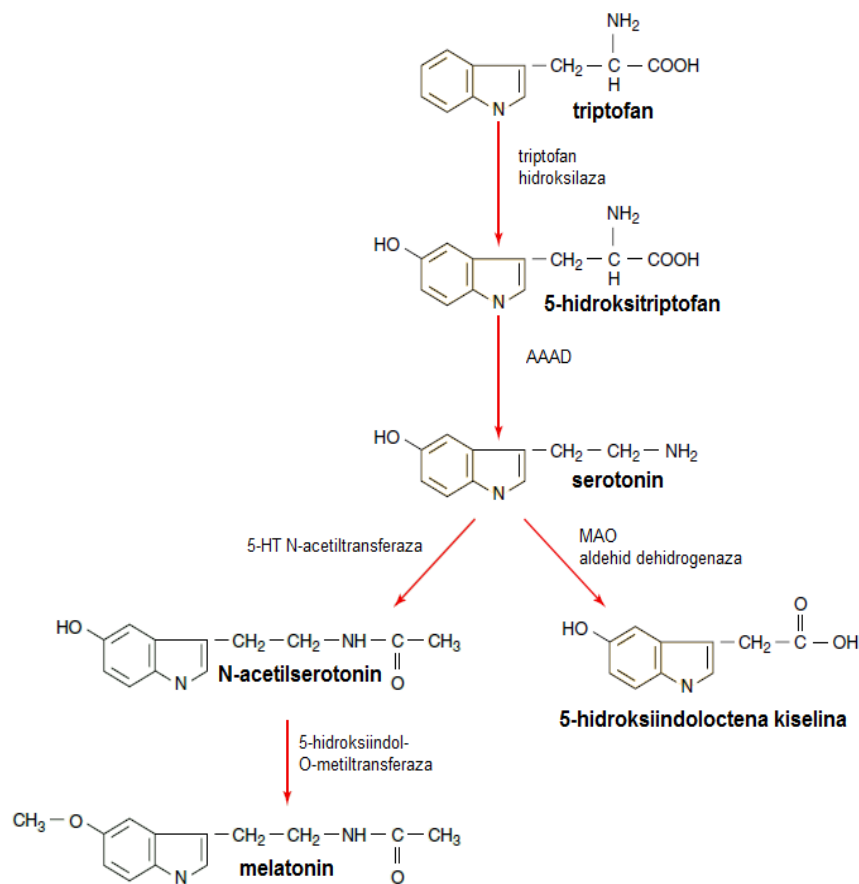
Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) biološki je aktivan amin s brojnim ulogama u mozgu i perifernim tkivima sisavaca, a zajedno s katekolaminima i histaminom spada u skupinu monoaminskih neurotransmitera (Mohammad-Zadeh i sur., 2008). Većina serotonina u organizmu nalazi se u perifernim tkivima, gdje ga primarno sintetiziraju enterokromafinske stanice sluznice tankog crijeva. Upravo iz ovih stanica je Vittorio Ersparmer 1937. prvi izolirao serotonin kojemu je tada nadjenao ime enteramin, a naziv serotonin kasnije su mu dodijelili Rapport i Page nakon što su ga izolirali iz seruma (Whitaker-Azmitia, 1999).

1.5.1.1. Biokemija i metabolizam serotonina

Strukturno se molekula serotonina sastoji od heterocikličkog indolskog prstena na koji su vezane hidroksilna i amino skupina. Kombinacija indolske jezgre i dušika primarnog amina koji služi kao akceptor protona čini serotonin pri fiziološkom pH hidrofilnim spojem (Hensler, 2006), a zbog hidrofilnog karaktera, serotonin ne može prolaziti kroz lipofilnu krvno-moždanu barijeru (Whitaker-Azmitia, 2005). Stoga je otkriće serotonina u mozgu (Twarog i Page, 1953) pokazalo da u organizmu postoje dva odvojena odjeljka serotonina – središnji, koji podrazumijeva središnji živčani sustav, te periferni, koji se odnosi na ostala tkiva koja su od središnjeg odjeljka odvojena krvno-moždanom barijerom. Sinteza serotonina zasebno je regulirana u oba odjeljka

aktivnošću triptofan hidroksilaze, enzima koji hidroksilacijom triptofana katalizira prvi korak u sintetskom putu serotonina (Slika 3) (Whittaker-Azmitia, 1999).

Triptofan hidroksilaza postoji u organizmu u obliku dva izoenzima - TPH2 prisutna je u neuronima, a TPH1 u enterokromafinskim stanicama gastrointestinalnog trakta i epifizi (Walther i sur., 2003). Produkt triptofan-hidroksilaze, 5-hidroksitriptofan, prevodi se u serotonin posredstvom enzima dekarboksilaze aromatskih aminokiselina (*engl.* aromatic L-amino acid decarboxylase, AAAD). Budući da je aktivnost dekarboksilaze aromatskih aminokiselina čak 75x veća od one triptofan hidroksilaze, korak hidroksilacije triptofana smatra se ograničavajućim faktorom u biosintetskom putu serotonina (Kema i sur., 2000). Nastali serotonin pohranjuje se u vezikulama presinaptičkog neurona, odnosno, u granulama enterokromafinskih stanica, u koje se prenosi pomoću vezikularnog transportera monoamina (*engl.* vesicular monoamine transporter, VMAT) (Hensler, 2006).

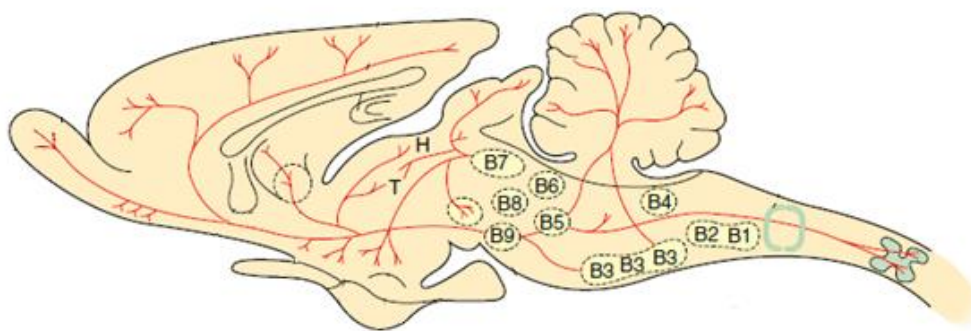


Slika 3. Sintetski i razgradni put serotonina. Preuzeto od Hensler, 2006.

Razgradnja serotonina odvija se primarno oksidativnom deaminacijom koju katalizira enzim monoamin oksidaza (*engl.* monoamine oxidase, MAO), pri čemu nastaje 5-hidroksiindol-octena kiselina. Postoje dvije izoforme ovog enzima, MAO A i B. Dok MAO A preferentno razgrađuje serotonin i noradrenalin, a MAO B feniletilamin, dopamin i tiramin supstrati su oba izoenzima (Hranilović i sur., 2011).

1.5.1.2. Središnji odjeljak serotonina

U središnjem živčanom sustavu, serotonergični neuroni organizirani su u devet skupina čije su soma smještene u moždanom deblu, a nazivaju se jezgre rafe. Svoje projekcije pružaju do različitih dijelova kore i subkortikalnih struktura (Slika 4) (Benes i sur., 2000). Široko rasprostranjene projekcije ovih neurona ukazuju na mnogobrojne funkcije serotonina kao neurotransmitera i neuromodulatora, poput regulacije bioloških ritmova (Palus i sur., 2013), apetita, sensorimotoričke reaktivnosti i osjetljivosti na bol (Lucki, 1998), a važna je i njegova uloga tijekom embrionalnog razvoja mozga (Whitaker-Azmitia, 2001). Osim u jezgrama rafe, serotonin u mozgu sintetiziran je i u epifizi, u kojoj se prevodi u melatonin, hormon važan u regulaciji sna (Slika 3) (Kema, 2000).



Slika 4. Prikaz sagitalnog presjeka mozga štakora. Ozačene su jezgre rafe (B1-B9) i njihove projekcije do različitih dijelova kore te subkortikalnih struktura. Preuzeto od Hensler, 2006.

Nepravilnosti u funkciji serotonina u središnjem živčanom sustavu vezane su uz poremećaje poput autizma, depresije, te opsesivno-kompulzivnog poremećaja (Hensler, 2006). U osoba s autizmom, primjerice, primijećene su niske razine serotonina u mozgu, dok su s druge strane u trećine osoba s autizmom ustanovljene povišene koncentracije serotonina u krvi (hiperserotoninemija) (Hranilović i sur., 2007). Veza između niskih središnjih i visokih perifernih razina serotonina u osoba s autizmom nije ustanovljena, no moguće objašnjenje je da promjene u ekspresiji gena koji reguliraju sintezu, pohranu ili razgradnju serotonina rezultiraju istovremeno smanjenim razinama serotonina u mozgu, a povećanim razinama u krvi. Također, moguće je da pojava hiperserotonemije tijekom fetalnog i neonatalnog razvoja uzrokuje smanjene razine serotonina u mozgu - budući da krvno-moždana barijera za vrijeme razvoja još nije u potpunosti formirana, visoke koncentracije serotonina mogu prijeći u mozak te inhibitorno djelovati na razvoj serotonergičnih neurona, što kasnije rezultira niskim razinama serotonina u mozgu (Blažević i sur., 2011).

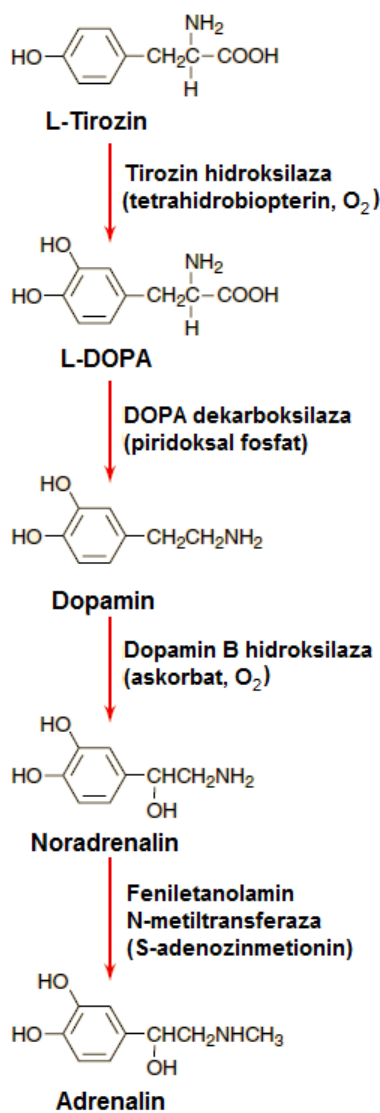
1.5.1.3. Periferni odjeljak serotonina

Većina serotonina u tijelu sisavaca - čak 90% - nalazi se u perifernom odjeljku, gdje serotonin sudjeluje u funkciji kardiovaskularnog i gastrointestinalnog sustava te aktivaciji trombocita (Berger i sur., 2009). Kao što je već spomenuto, sinteza serotonina odvija se u enterokromafinskim stanicama tankog crijeva, a iz njih se serotonin oslobađa u krvotok. Većina serotonina otpuštenog u krvotok pohranjuje se zatim u trombocitima, gdje igra ulogu u njihovoj agregaciji prilikom stvaranja ugruška (Berger i sur., 2009).

1.5.2. Katekolamini

Dopamin, noradrenalin (norepinefrin) i adrenalin (epinefrin) neurotransmiteri su i hormoni zajedničkog naziva katekolamini prema katekolu, benzenskom prstenu s dvije hidroksilne skupine koji čini strukturni kostur ovih spojeva. Prekursor u sintezi svih katekolamina je aminokiselina tirozin, koju enzim tiroksin hidroksilaza prevodi u L-DOPA. Ovaj enzim prisutan je u svim stanicama koje sintetiziraju katekolamine i mjesto je regulacije njihovog sintetskog puta (Kuhar i sur., 2006). Dekarboksilacijom L-DOPA, posredstvom enzima dekarboksilaze

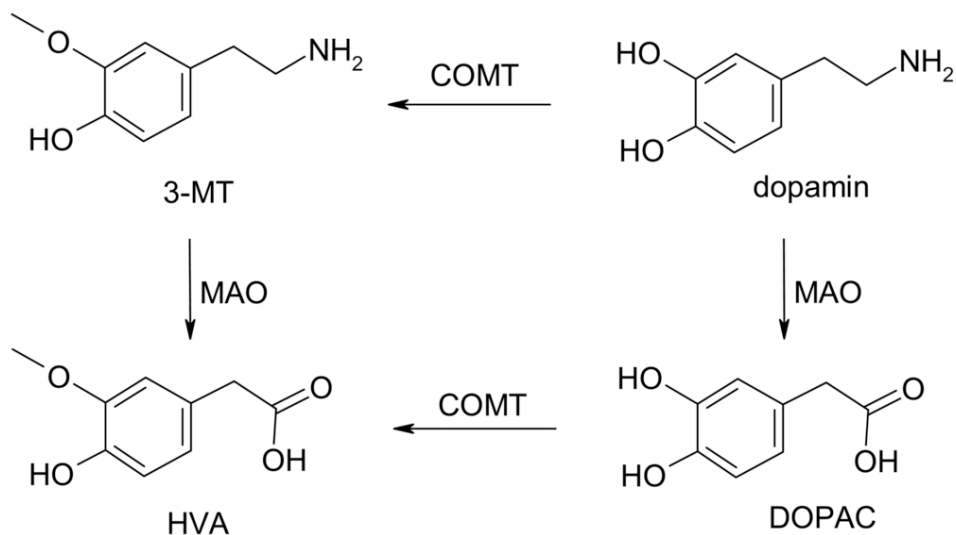
aromatskih aminokiselina, nastaje dopamin - najjednostavniji katekolamin (Meiser i sur., 2013) (Slika 5).



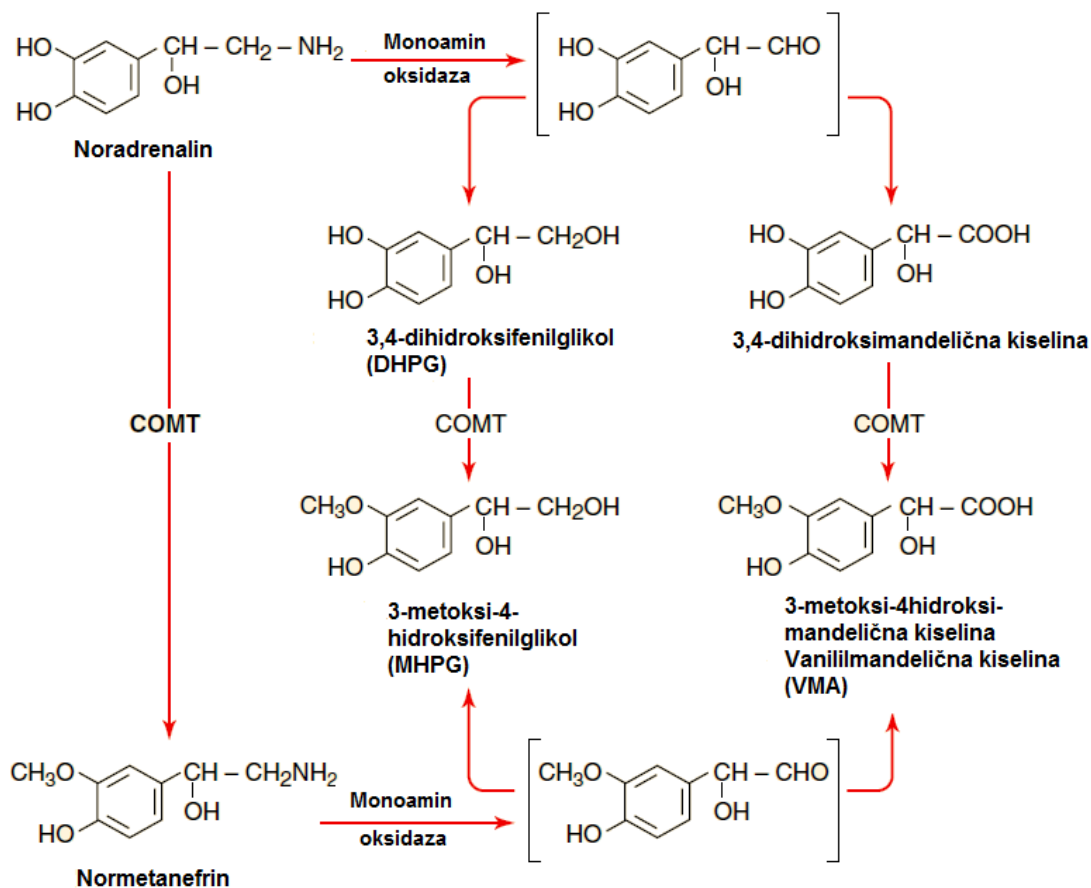
Slika 5. Sintetski put katekolamina. Preuzeto od Kuhar i sur., 2006.

Dopamin je sintetiziran u citoplazmi iz koje ga vezikularni monoaminski transporter (VMAT2 u neuronima) prebacuje u sinaptičke vezikule, u kojima je stabiliziran kiselim pH (Sulzer i sur., 2000). Dopamin hidroksilaza, enzim koji β-hidroksilacijom dopamina stvara noradrenalin, nalazi se unutar vezikula (Kuhar i sur., 2006) (Slika 5).

U razgradnji katekolamina, osim ranije spomenutog enzima monoamin oksidaze koji razgrađuje i serotonin, sudjeluje i enzim katekol-o-metiltransferaza (*engl.* catechol-o-methyltransferase, COMT), enzim prisutan u mozgu i perifernim tkivima (Myöhänen i sur., 2010). Glavni metabolit dopamina je homovanilična kiselina (HVA) (Slika 6), dok su za noradrenalin glavni produkti razgradnje 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol (MHPG) i vanililmandelična kiselina (VMA) (Slika 7) (Kuhar i sur., 2006).



Slika 6. Razgradni putevi dopamina. Preuzeto od O'Neill (1995).



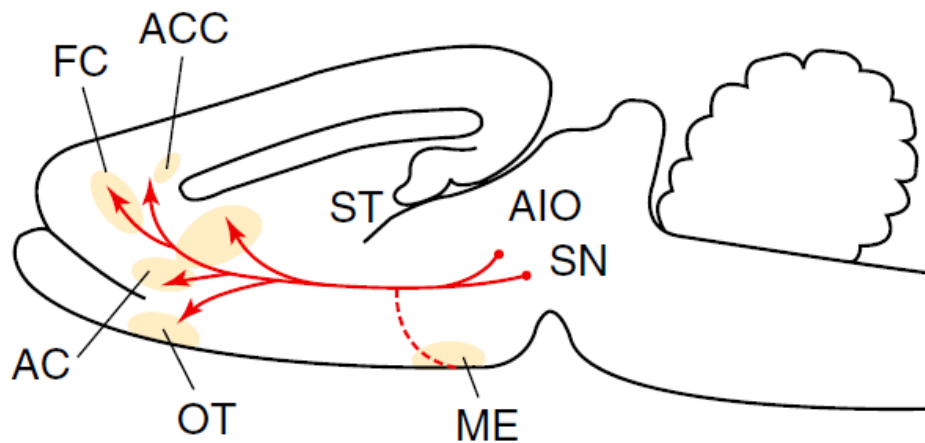
Slika 7. Razgradni putevi noradrenalina. Preuzeto od Kuhar i sur., 2006.

1.5.2.1. Dopamin

U središnjem živčanom sustavu dva su glavna puta dopaminergičnih neurona, nigrostrijatalni i mezolimbčki. Nigrostrijatalni put čine dopaminergički neuroni smješteni u strukturi srednjeg mozga, koja je zahvaljujući svojoj crnoj boji stekla naziv *substantia nigra*. Neuroni *substantie nigre* pružaju svoje okončine prema bazalnim ganglijima - putamenu, striatumu i globusu pallidusu - te prednjem mozgu. Glavna funkcija ove neuralne mreže koordinacija je voljnih pokreta (Kolb i Whishaw, 2006).

Dok je nigrostrijatalni put zadužen za kontrolu pokreta, neuroni mezolimbčkog puta odgovorni su za motiviranje ponašanja koje je važno za opstanak jedinke i vrste, poput hranjenja i spolne aktivnosti (Wise, 2004). Anatomske komponente ovog puta su dopaminergičke jezgre ventralnog tegmentuma, a svoje projekcije šalju do struktura limbickog sustava i *nucleus accumbens* (Slika

8). Razina dopamina izlučenog u *nucleus accumbens* kao odgovor na podražaj iz okoliša kodira njegov ‘nagrađujući’ efekt, stoga se ovaj sustav naziva i ‘sustavom nagrade’, a predstavlja i osnovu kojom droge stvaraju ovisnost, budući da redom izazivaju pojačano izlučivanje dopamina u *nucleus accumbens* (Hyman i sur., 2006).

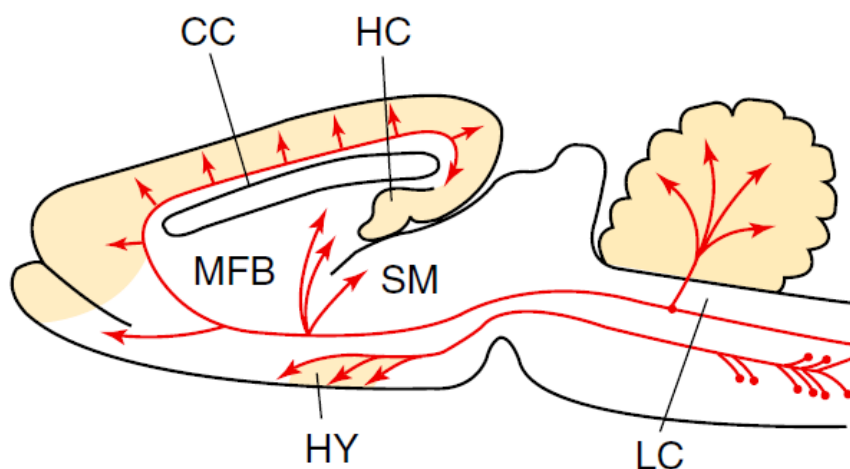


Slika 8. Prikaz sagitalnog presjeka mozga štakora. Označene su strukture dopaminskog sustava: *substantia nigra* (SN), ventralni tegmentum (A10), eminencija medijana (ME), striatum (ST), olfaktorni trabekul (OT), *nucleus accumbens* (AC), frontalni korteks (FC), anteriorni cingulatni korteks (ACC). Preuzeto od Kuhar i sur., 2006.

Iako nigrostrijatalni i mezolimbčki putevi obnašaju naizgled odvojene funkcije, ove strukture anatomske su i funkcionalno isprepletene u mrežu u kojoj aktivnost dopamina objedinjuje motivaciju za stjecanjem nagrađujućeg podražaja s iniciranjem potrebnog motoričkog odgovora. Poremećaji u funkciji dopamina u mozgu mogu rezultirati nemogućnošću regulacije motoričkih funkcija, kao što je to slučaj u Parkinsonovoj bolesti. Zbog propadanja dopaminergičkih neurona *substantie nigre*, u osoba s Parkinsonovom bolesti javljaju se simptomi poput tremora, rigidnog držanja i bradikinezije, odnosno, sporosti u pokretima (Beitz, 2014). Osim poremećaja motoričkih funkcija, neki od kognitivnih poremećaja također su posljedica disfunkcije dopaminskog sustava. Tako se smatra da u shizofreniji povećana aktivnost dopaminskog sustava dovodi do pojave simptoma psihoze (Rolls i sur., 2008).

1.5.2.2. Noradrenalin

Primarni izvor noradrenergičkih neurona u centralnom živčanom sustavu je *locus coeruleus*, jezgra smještena u moždanom deblu. Aksoni neurona iz *locusa coeruleusa* široko su rasprostranjeni po prednjem mozgu, što ukazuje na važnu ulogu noradrenalina u regulaciji kognitivnih funkcija i ponašanja (Slika 9).



Slika 9. Prikaz sagitalnog presjeka mozga štakora. Označene su jezgre noradrenergičnih neurona (*locus coeruleus*, LC) te dijelovi mozga u kojima imaju svoje završetke - hipotalamus (HY), *stria medullaris* (SM), medijalni svežanj prednjeg mozga (MFB), hipokampus (HC), *corpus callosum* (CC). Preuzeto od Kuhar i sur. (2006).

Noradrenergični neuroni *locusa coeruleusa*, zajedno s nekoliciinom drugih jezgara u moždanom deblu, uključujući serotonergične neurone jezgara rafe, čine retikularni aktivacijski sustav (Kolb i Whishaw, 2006). Zadaća ovog sustava različitih neurotransmitera održavanje je budnog i alertnog stanja aktivacijom neurona u kori, a noradrenergični neuroni pritom moduliraju prikupljanje senzoričkih informacija tako da organizam posvećuje pažnju važnim i potencijalno opasnim signalima iz okoliša. Mjerenje aktivnosti neurona *locusa coeruleusa* u animalnim modelima dovelo je u vezu povećanu aktivnost ovih neurona s osjetljivošću organizma na stres, stoga se dovode u vezu s anksioznošću, depresijom i posttraumatskim stresnim poremećajem (Leonard, 2001).

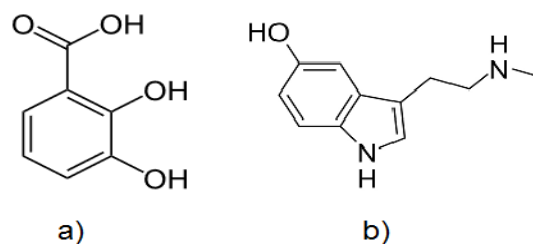
1.6. Metode mjerenja razina serotonina i katekolamina u biološkim uzorcima

Kromatografske tehnike često su korištene za određivanje razina serotonina i katekolamina u biološkim uzorcima. Primjerice, Liang i sur. (1998) opisali su razdvajanje ovih spojeva plinskom kromatografijom, a tekućinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom za određivanje serotonina i indolamina u urinu razvili su Moriarty i sur. (2011). Od ostalih metoda korištenih u određivanju razina serotonina i katekolamina u biološkim uzorcima valja spomenuti i kapilarnu elektroforezu (Lunte i O'Shea, 1994). Među najčešće korištene metode za određivanje razina serotonina, dopamina i noradrenalina spadaju HPLC s različitim načinima detekcije, te ELISA (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay).

1.6.1. HPLC u određivanju serotonina i katekolamina u biološkim uzorcima

Serotonin, dopamin i noradrenalin polarni su spojevi blago bazičnog karaktera, stoga je za njihovo odjeljivanje pogodna kromatografija reverzne faze. Postoje brojne kombinacije pufera i organskih otapala koje se koriste u analizi monoamina s takvim principom razdjeljivanja. Thomas i sur. (2015) ispitali su kombinaciju fosforne kiseline i metanola, zatim octene kiseline i metanola, a na kraju su najbolje razdvajanje serotonina i noradrenalina dobili korištenjem mravlje kiseline i acetonitrila. Sanaye i Joglekar (2015) također su koristili kombinaciju mravlje kiseline i acetonitrila, dok su Komura i Sakamoto (1990) koristili kao pufer fosfornu kiselinu s dodatkom EDTA i natrijeva heptan-sulfonata.

U kromatografskim metodama koje koriste metodu unutarnjeg standarda za kvantifikaciju serotonina, kao unutarnji standard koristi se N-metilserotonin (Tekes, 2008), dok se za istu svrhu kod katekolamina koristi 2,3-dihidroksibenzoična kiselina (DHBA) (Slika 10) (He i sur., 1997).



Slika 10. Unutarnji standardi korišteni za kvantifikaciju a) katekolamina (3,4-dihidroksibenzilamin), b) serotoninina (N-metilserotonin).

Za analizu serotoninina i katekolamina metodom HPLC dostupni su različiti tipovi detektora. Komura i Sakamoto (1990) navode da je fluorescentna detekcija moguća za primarne amine, no ne i za njihove metabolite. Uz fluorescentni detektor (Yoshitake i sur., 2004), za detekciju indolamina i katekolamina koristi se i kemiluminiscentni detektor (Tsunoda, 2005), elektrokemijski detektor (Hranilović i sur., 2011; Liu i sur., 2000), te detekcija masenom spektrometrijom (de Jong i sur., 2010).

Indolamini i katekolamini pogodni su također za detekciju ultraljubičastim detektorom zahvaljujući heterocikličkom prstenu u njihovoj strukturi koji spremno apsorbira elektromagnetsko zračenje u ultraljubičastom dijelu spektra. Apsorpcijski maksimum pokazuju na valnoj duljini od 280 nm (Komura i Sakamoto, 1990). Ipak, u literaturi je opisan tek mali broj metoda koje se zasnivaju na primjeni ultraljubičastog detektora u detekciji ovih spojeva, dok je elektrokemijska detekcija i dalje najpopularniji način određivanja njihovih razina u biološkim uzorcima. Iako prednost elektrokemijskog detektora leži u njegovoj preciznosti, zbog čestog javljanja šuma na detektoru njegovo korištenje nije pogodno za rutinske analize (Yoshitake i sur., 2004). Komura i Sakamoto (1990) razvili su metodu HPLC reverzne faze s UV detekcijom za analizu serotoninina, katekolamina i njihovih razgradnih produkata u uzorcima mozga miša, no u pripremi mobilne faze koristili su pufer visoke ionske jakosti, koji može uzrokovati taloženje soli u kromatografskoj koloni. Thomas i sur. (2015) pokazali su da je mobilna faza koja se sastoji samo od 0,05% mravlje kiseline i acetonitrila u omjeru 90:10 dovoljna za brzo i pouzdano razdvajanje noradrenalina i serotoninina. Odabir UV detektora stoga predstavlja dobru osnovu za razvoj metode HPLC za određivanje razina serotoninina i katekolamina.

1.6.2. ELISA u određivanju serotonina i katekolamina u biološkim uzorcima

ELISA je analitička metoda koja detekciju analita temelji na njegovoj interakciji s antitijelom, a kvantifikaciju na određivanju koncentracije produkta reakcije koju katalizira enzim vezan na antitijelo. Postoje dvije verzije ove metode - kompetitivna i nekompetitivna. U kompetitivnom načinu, antigen vezan za jažice mikrotitarske pločice kompetira s analitom iz uzorka za vezno mjesto na primarnom antitijelu. Ova metoda pogodna je za određivanje koncentracija malih molekula, pa tako i indolamina i katekolamina. Primjerice, Kim i sur. (2008) razvili su kompetitivnu metodu ELISA za određivanje katekolamina u serumu, a Nichkova i sur. (2012) razvili su metodu za određivanje serotonina u urinu. Razvoju kompetitivne metode ELISA zapravo se rijetko pribjegava zbog široke dostupnosti komercijalnih kompleta koji su i vrlo jednostavni za korištenje. Nekompetitivna ELISA koristi antitijelo vezano na jažice pločice za vezanje analita, a na taj kompleks veže se zatim antitijelo s konjugiranim enzimom. Ovaj tip metode ne koristi se za male molekule poput monoamina, jer zahtjeva vezanje dvaju antitijela na molekulu analita, stoga je prikladnija za analizu makromolekula (Venn, 2008).

2. Cilj

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu šireg istraživanja utjecaja perinatalno povišenih koncentracija serotonina na fiziologiju i ponašanje štakora (Hranilović i sur., 2011; Blažević i sur., 2012). Tijekom istraživanja, povišene koncentracije serotonina izazvane su administracijom njegovog prekursora (5-hidroksitriptofan) ili tranilciprominom, inhibitorom enzima monoamin oksidaze koji katalizira razgradnju serotonina. Kako je spomenuto u uvodu ovog rada, enzim monoamin oksidaza također sudjeluje u razgradnim putevima dopamina i noradrenalina, a uključivanje ovih dvaju neurotransmitera u istraživanje nužno je za bolje razumijevanje molekularnih, fizioloških i bihevioralnih promjena u animalnom modelu hiperserotoninemije. Stoga je cilj ovog diplomskog rada uspostaviti i validirati metodu HPLC s UV detekcijom kojom će se istovremeno moći odrediti koncentracije serotonina, dopamina i noradrenalina u tkivu mozga štakora, a koja bi zahvaljujući svojoj preciznosti i ekonomičnosti zamijenila dosad korištenu metodu ELISA u istraživanju posljedica perinatalno povišenih koncentracija serotonina. Uz to, razvoj ove metode poslužit će kao polazna točka za razvoj metode HPLC kojom će se moći odrediti i razine serotonina, dopamina i noradrenalina u krvnoj plazmi, te razine prekursora i razgradnih produkata ovih neurotransmitera u moždanom i perifernim tkivima.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci tkiva mozga

U izradi ovog rada koristila sam uzorke prefrontalne kore mozga Wistar štakora starih 22 dana. Postupak izolacije uzoraka opisan je u Metodama (3.2.1.).

3.1.2. Kemikalije

Korištene za pripremu deproteinizacijske otopine:

- 70% perklorna kiselina, HClO_4 (Sigma Aldrich, Njemačka)
- etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Sigma Aldrich, Njemačka)
- natrijev metabisulfit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Sigma Aldrich, Njemačka)

Korištene za pripremu standarda:

- serotonin, analitički standard (Sigma Aldrich, Njemačka)
- dopamin hidroklorid (Sigma Aldrich, Njemačka)
- L-norepinefrin hidroklorid, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Njemačka)
- L-triptofan, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Njemačka)
- L-tirozin hidroklorid (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 5-hidroksiindol-3-octena kiselina, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Njemačka)
- DL-4-hidroksi-3-metoksimandelična (vanililmandelična) kiselina (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 4-hidroksi-3-metoksifeniloctena (homovanilična) kiselina (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 4-hidroksi-3-metoksifenilglikol hemipiperazin (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 0,5 M HCl
- 70% etanol

Korištene kao mobilne faze za HPLC:

- 89-91% mravlja kiselina, HCOOH (Sigma Aldrich, Njemačka)
- acetonitril, HPLC čistoće (Fisher Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- metanol, HPLC čistoće (Avantor Performance Materials, Poljska)

Korištene za određivanje koncentracije serotonina metodom ELISA:

- Komplet Serotonin Research ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Njemačka)

Korištene za određivanje koncentracije dopamina i noradrenalina metodom ELISA:

- Komplet 2-CAT Research (N+D) ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Njemačka)

3.1.3. Tehnička pomagala i pribor

- kromatografska kolona reverzne faze Kromasil 100-5-C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm) (AkzoNobel, Švedska)

- sustav HPLC Perkin Elmers Series200 (SAD) sljedećih komponenata:

- kvarterna pumpa
- otplinjač
- ubrizgavač uzorka
- automatski uzorkovač
- UV-detektor

- centrifuga, eppendorf 5702 (Eppendorf AG, Njemačka)

- stolna mini centrifuga, Cat. No. 05-090-129 (Fisher Scientific, Koreja)

- vakuum-pumpa

- autoklav

- ultrazvučna sonda (Bandelin Sonopuls, Njemačka)
- magnetska miješalica (Elektrosanitarij, Hrvatska)
- mikropipete (Transferpette S, Brand, Njemačka)
- hladnjak (+4 °C)
- zamrzivači (-20 °C, -80 °C)
- vaga (Kern&Sohn, Njemačka)
- vibracijska miješalica, EV-100 (Tehnica, Slovenija)
- pH metar (Schott Instruments, Njemačka)
- čitač mikrotitarskih pločica, Model 550 (Bio-Rad, Japan)
- inkubator (37 °C)
- filteri promjera 0,22 µm
- vijalice i inserti za HPLC

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija uzoraka prefrontalne kore

Za analizu koncentracija serotonina, dopamina i noradrenalina metodama HPLC i ELISA koristila sam uzorke prefrontalne kore izolirane iz Wistar štakora starih 22 dana. Žrtvovanje životinja napravljeno je u skladu sa zakonima Hrvatske i Europske Unije. Životinje su anestetizirane stavljanjem u eksikator s vatom natopljenom izofluranom, nakon čega su dekapitirane. Odstranjeni mozak stavljen je na ohlađenu podlogu. Napravljen je koronarni rez širine 5 mm na frontalnim reznjevima s kojeg je izolirana kora anteriorno od bregme. Uzorci kora zatim su izvagani i pospremljeni u zamrzivač na -80 °C.

3.2.2. Priprema uzoraka - homogenizacija uzoraka prefrontalne kore i ekstrakcija monoamina

Za pripremu uzoraka, modificirala sam protokol koji su koristili Hranilović i sur. (2011). Pripremila sam deproteinizacijsku otopinu (Tablica 1) kojoj sam pH podesila na 3,1 pomoću 0,1 M NaOH. Uzorke tkiva mozga homogenizirala sam pomoću ultrazvučne sonde u 5 volumena (w/v) deproteinizacijske otopine. Budući da ultrazvučna sonda prilikom korištenja zagrijava uzorak, koristila sam hladnu deproteinizacijsku otopinu, a homogenizaciju sam provodila maksimalno dvadesetak sekundi te pritom tubicu s uzorkom držala na ledu. Odmah nakon homogenizacije, uzorke sam centrifugirala 20 minuta pri 23390 x g na temperaturi od +4 °C. Supernatant sam pažljivo ispipetirala u čistu tubicu, te ponovila centrifugiranje pri istim uvjetima. Dobiveni supernatant alikvotirala sam u tri dijela. U slučaju da uzorak nisam analizirala odmah nakon pripreme, pospremila sam ga u zamrzivač na - 80 °C.

Tablica 1. Priprema deproteinizacijske otopine (50 ml) za homogenizaciju uzoraka tkiva mozga.

komponenta smjese	Mr (g/mol)	početna koncentracija	dodan volumen (ml)	dodana masa (mg)	konačna koncentracija (mM)
HClO ₄	100,46	70%	0,431 ml	-	0,1 M
Na ₂ S ₂ O ₅	190,11	-	-	3,80 mg	0,4 mM
EDTA	292,24	-	-	2,92 mg	0,2 mM

3.2.3. Mjere prevencije za očuvanje kromatografske kolone

Kako bih spriječila unošenje čestica u kromatografsku kolonu koje bi je mogle začepiti, za pripremu deproteinizacijske otopine koristila sam vodu koju sam autoklavirala (30 min, 120 °C) te potom profiltrirala pomoću vakuum pumpe. Staklene boce koje sam koristila za čuvanje deproteinizacijske otopine te mobilnih faza za HPLC oprala sam detergentom, dobro isplahnula vodom iz slavine te potom destiliranom vodom. Čisto posuđe ostavila sam zatim u sušioniku 3 sata na 200 °C.

Cjevčice kroz koje su mobilne faze dolazile do pumpe HPLC sustava imale su filtere kako eventualne nečistoće ne bi dospjele u kolonu. Na kraju svakog dana korištenja, kolonu sam ispirala 30 minuta 85% metanolom.

Također, ispitala sam utjecaj filtriranja te dodatnog koraka centrifugiranja u pripremi uzoraka na izgled kromatograma, odnosno, razlučivost pikova. Homogenat probnog uzorka tkiva mozga podvrgnula sam sljedećim postupcima:

1. centrifugiranje pri 14 500 x g (4 °C)
2. filtriranje dobivenog supernatanta kroz pore promjera 0,22 µm
3. centrifugiranje filtrata pri 14 500 x g (4 °C)

Nakon svakog koraka, od uzorka sam odvojila alikvot koji sam testirala metodom HPLC, a ostatak sam koristila za idući korak. Usporedila sam kromatograme istog uzorka nakon jednog koraka centrifugiranja (14500 x g, +4 °C), zatim filtriranja, te potom drugog koraka

centrifugiranja ($14500 \times g$, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Budući da nije bilo razlike u kromatogramima uzorka nakon prvog centrifugiranja i filtriranja, korak filtracije izostavila sam iz pripreme daljnjih uzoraka tkiva mozga. Međutim, dodatni korak centrifugiranja pokazao je zamjetan utjecaj na razlučivost pikova na kromatogramu naspram samo jednog centrifugiranja, stoga sam u pripremi uzoraka koristila dva koraka centrifugiranja. Kromatogrami koji ilustriraju ispitivanje utjecaja filtriranja i centrifugiranja na razlučivost pikova prikazani su u Rezultatima (4.1.).

3.2.4. Priprema standardnih otopina

Standardnu otopinu serotonina pripremila sam u početnoj koncentraciji od $20\text{ }\mu\text{M}$ otapanjem potrebne mase serotonina (Tablica 2) prvo u $500\text{ }\mu\text{l}$ $0,5\text{ M HCl}$, te zatim razrjeđivanjem u istoj deproteinizacijskoj otopini koju sam koristila za homogenizaciju uzoraka tkiva mozga.

Standardne otopine dopamina, noradrenalina, tirozina, triptofana, 5-hidroksiindol-octene kiseline, homovanilične i vanililmandelične kiseline pripremila sam u početnoj koncentraciji od $1\text{ }\mu\text{M}$ otapanjem svake kemikalije prvo u $200\text{ }\mu\text{l}$ otapala preporučenog od strane proizvođača (Tablica 2), a zatim sam početni volumen također razrijedila deproteinizacijskom otopinom do 10 ml .

Standardnu otopinu 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola pripremila sam u početnoj koncentraciji od $0,5\text{ }\mu\text{M}$ na isti način kao i ostale standarde (Tablica 2).

Alikvote pripremljenih početnih otopina koristila sam za pripremu daljnjih razrjeđenja istog standarda, te smjesa standarda. Za razvoj metode HPLC koristila sam smjese svih osam standarda, kako bih odredila odnos između njihovih retencijskih vremena te bolje prikazala kemijski sastav uzorka tkiva mozga. Smjese standarda serotonina, dopamina i noradrenalina koristila sam u identifikaciji pikova metodom dodavanja vanjskog standarda te u izradi baždarnih krivulja za određivanje koncentracije serotonina, dopamina i noradrenalina u uzorcima tkiva mozga.

Tablica 2. Priprema otopina standarda serotoninina (5HT), dopamina (DA), noradrenalina (NA), triptofana (TRP), tirozina (TYR), 5-hidroksiindol-octene kiseline (5HIAA), vanililmandelične kiseline (VMA), homovanilične kiseline (HVA) i 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola (MHPG).

standard	Mr (g/mol)	izvagana masa (mg)	konačni volumen (ml)	konačna koncentracija (μ M)	otapalo
5HT	176,22	7,8	2,216	20	0,5 M HCl
DA	189,64	1,9	10	1	H ₂ O
NA	205,64	2,1	10	1	0,5 M HCl
TRP	204,23	2,0	10	1	0,5 M HCl
TYR	217,65	2,2	10	1	0,5 M HCl
5HIAA	191,18	1,9	10	1	70% EtOH
VMA	198,17	2,0	10	1	H ₂ O
HVA	182,17	1,8	10	1	70% EtOH
MHPG	227,26	1,1	10	0,5	H ₂ O

3.2.5. Identifikacija pikova koji pripadaju serotoninu, dopaminu i noradrenalinu na kromatogramu dobivenom analizom uzorka tkiva mozga

Kako bih sa sigurnošću odredila na kromatogramu dobivenom razdvajanjem uzorka tkiva mozga koji pikovi pripadaju serotoninu, dopaminu te noradrenalinu, korištenjem metode dodavanja vanjskog standarda (*engl.* spiking) pratila sam koji su pikovi povećani nakon dodavanja vanjskog standarda u uzorak. Pripremila sam četiri alikvota istog uzorka tkiva mozga, a svakome sam dodala po jedan od standarda neurotransmitera. Alikvot uzorka bez dodanog vanjskog standarda služio je kao kontrola. Pritom sam vodila računa o tome da uzorak mozga bude jednako razrijeđen u svim alikvotima (Tablica 3). Kao pufer za razrjeđivanje uzorka koristila sam istu deproteinizacijsku otopinu u kojoj sam prethodno homogenizirala uzoke i pripremala otopine standarda. Smjesu standarda, razrijeđen alikvot čistog uzorka, te alikvote s dodanim standardom serotoninina, dopamina ili noradrenalina analizirala sam HPLC-om prema odabranoj metodi. Povećanje površine pika u uzorku s dodanim vanjskim standardom u odnosu na onaj bez

dodanog vanjskog standarda, pri retencijskom vremenu koje odgovara standardu, smatrala sam potvrdom identifikacije. Valna duljina pri kojoj su analiti detektirani bila je 280 nm.

Tablica 3. Priprema razrijeđenja uzorka s dodanim vanjskim standardom za identifikaciju retencijskog vremena pikova na kromatogramu. Početna koncentracija dodanih vanjskih standarda iznosila je 1 μ M.

smjesa	volumen komponente smjese (μ l)					ukupan volumen smjese (μ l)
	mozak	5HT	DA	NA	pufer	
1) mozak	20	-	-	-	140	160
2) smjesa standarda	-	20	20	20	100	160
3) mozak + 5HT	20	20	-	-	120	160
4) mozak + DA	20	-	20	-	120	160
5) mozak + NA	20	-	-	20	120	160

3.2.6. Razvoj metode HPLC

Kao polaznu točku u razvoju metode, odabrala sam metodu izokratne elucije s 0,05% mravljom kiselinom i acetonitrilom u omjeru 90:10, prema radu Thomasa i sur. (2015). U nastavku razvoja metode, odabrala sam gradijentan način elucije, a parametre metode (Tablica 4) optimizirala sam dok nije postignuto dobro razdvajanje serotonina, dopamina i noradrenalina u probnim uzorcima tkiva mozga i smjesama standarda.

Tablica 4. Raspon ispitivanih parametara tijekom optimizacije HPLC metode.

parametar metode	raspon
protok	0,5 - 0,8 ml/min
udio organske faze	0,5 - 20%
trajanje	5 - 25 min
volumen injektiranja	10 – 50 μ l

3.2.7. Validacija metode

Nakon što sam odabrala parametre metode koji su pokazali najbolje razdvajanje, odabranu metodu validirala sam ispitavši njenu selektivnost, linearnost i ponovljivost. Pritom sam se vodila kriterijima koje su za validaciju koristili Wu i sur. (2014).

3.2.7.1. Selektivnost

Selektivnost sam odredila kao dobro razdvajanje pikova na kromatogramima, bez preklapanja pikova analita s pikovima drugih spojeva. Kao znak dobre selektivnosti metode uzela sam i simetričnost pikova analita.

3.2.7.2. Linearnost

Za testiranje linearnosti metode, pripremila sam sedam smjesa standarda (Tablica 5), koje sam uzastopno propustila na HPLC-u. Za svaki standard napravila sam baždarnu krivulju ovisnosti površine pika o koncentraciji. Kao pokazatelj dobre linearnosti uzela sam $R^2 > 0,99$.

Tablica 5. Koncentracije serotonina, dopamina i noradrenalina u standardnim otopinama korištenima za testiranje linearnosti metode.

smjesa standarda	koncentracija (nM)		
	5HT	DA	NA
1	333	333	333
2	166,5	166,5	166,5
3	83,25	83,25	83,25
4	2500	100	50
5	1250	50	25
6	500	20	10
7	125	5	2,5

3.2.7.3. Ponovljivost

Ponovljivost metode odredila sam kao ponovljivost rezultata unutar istog i između različitih dana. Ponovljivost sam izrazila kroz postotak relativne standardne devijacije, koji ukazuje na varijabilnost rezultata u odnosu na njihov prosjek (*engl.* relative standard deviation, RSD). Manji postotak relativne standardne devijacije pritom je ukazivao na bolju ponovljivost.

Ponovljivost unutar istog dana testirala sam propuštanjem istog uzorka tkiva mozga tri puta uzastopno, te zatim usporedila površine pikova za svaki analit između triju dobivenih kromatograma izračunavši prosječnu površinu pika sa standardnom devijacijom za svaki analit. Zatim sam iz omjera standardne devijacije i prosječne površine pika odredila postotak relativne standardne devijacije.

Ponovljivost između različitih dana testirala sam propuštanjem iste smjese standarda tijekom dva dana. Kao i kod testiranja ponovljivosti unutar istog dana, odredila sam prosječnu površinu pika i pripadajuću standardnu devijaciju za svaki analit, iz kojih sam zatim izračunala postotak relativne standardne devijacije. Ovaj postupak sam napravila za tri smjese međusobno različitih koncentracija analita, stoga je u Rezultatima prikazan prosjek relativnih standardnih devijacija

triju različitih smjesa (izražen kao postotak vrijednosti standardne devijacije u odnosu na srednju vrijednost).

3.2.8. Određivanje koncentracije serotonina, dopamina i noradrenalina u uzorcima mozga metodom HPLC

Koncentracije serotonina, dopamina i noradrenalina odredila sam u 7 uzoraka tkiva mozga pomoću odabrane metode HPLC. Iz probnih uzoraka odredila sam površine pikova serotonina, dopamina i noradrenalina prema kojima sam procijenila potrebne koncentracije standarda za izradu baždarne krivulje tako da krajnje točke na krivulji budu najmanje 50% veće, odnosno, manje od očekivane koncentracije u uzorcima - na taj način osigurala sam da dobivene vrijednosti koncentracija u uzorku budu unutar linearnog raspona ovisnosti površine pika o koncentraciji (Tablica 6).

Tablica 6. Koncentracije standarda serotonina, dopamina i noradrenalina u četiri smjese korištene za izradu kalibracijskih krivulja pri određivanju koncentracija analita u uzorcima tkiva mozga.

smjesa standarda	koncentracija (nM)		
	5HT	DA	NA
1	2500	100	50
2	1250	50	25
3	500	20	10
4	125	5	2,5

Pomoću smjesa standarda konstruirala sam za svaki analit baždarni pravac ovisnosti površine pika o koncentraciji. Nakon što sam u programu TotalChrom dobila površine pikova serotonina, dopamina i noradrenalina, izračunala sam njihove koncentracije koristeći jednadžbu pravca.

Rezultate izražene u jedinicama nmol/L preračunala sam u masu (ng) traženog analita po gramu tkiva uzorka kore mozga prema sljedećoj formuli (primjer za izračun mase serotonina):

$$\frac{\text{ng 5HT}}{\text{g PFC}} = \frac{\text{koncentracija 5HT (nmol/l)} \times \text{volumen injekcije } (\mu\text{l}) \times \text{Mr 5HT (g/mol)} \times R}{\text{masa PFC (g)}}$$

Pri čemu je PFC prefrontalna kora, Mr molarna masa, a R faktor razrjeđenja dobiven iz omjera volumena deproteinizacijske smjese korištene u homogenizaciji pojedinog uzorka i volumena injektiranja.

Istu formulu koristila sam za preračun nanomolarnih koncentracija dopamina i noradrenalina u nanograme po gramu tkiva, koristeći odgovarajuću molarnu masu.

3.2.9. *Određivanje koncentracije serotonina u uzorcima tkiva mozga metodom ELISA*

Kao dodatnu potvrdu valjanosti razvijene HPLC metode, koncentracije serotonina, dopamina i noradrenalina odredila sam komercijalno dostupnom metodom ELISA u istim uzorcima kojima sam koncentracije odredila odabranom HPLC metodom. Koristila sam poseban komplet za određivanje serotonina, te poseban za određivanje katekolamina. Oba kompleta temelje se na kompetitivnoj metodi ELISA, u kojoj analit iz uzorka i antigen vezan za mikrotitarsku pločicu kompetiraju za vezno mjesto na primarnom antitijelu. Sekundarno antitijelo konjugirano je s peroksidazom, čiji supstrat - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB – nakon enzimatske konverzije daje produkt čija se količina određuje očitavanjem apsorbancije pri 450 nm.

Koncentracije serotonina u uzorcima tkiva mozga odredila sam pomoću kompleta Serotonin Research ELISA prema priloženom protokolu. Uzorke sam, zajedno sa standardima i kontrolama iz kompleta, pipetirala prvo u jažice pločice za acilaciju. Korak acilacije potreban je kako bi primarno antitijelo moglo prepoznati i vezati se na serotonin. Zatim sam u svaku jažicu dodala acilacijski pufer, a nakon što je od reakcije prošlo 30 minuta, 100 μl aciliranih uzoraka, standarda i kontrola pipetirala sam u jažice mikrotitarske pločice, koja sadrži u svojim jažicama

vezani acilirani serotonin. Pošto sam dodala u svaku jažicu po 25 μ l antiseruma, pločicu sam prekrila folijom te ostavila u hladnjaku na +4 °C tijekom 20 h kako bi za to vrijeme došlo do vezanja antitijela na acilirani serotonin iz uzorka ili onog koji je vezan za jažicu pločice. Nakon što sam dekantirala antiserum iz jažica, isprala sam ih tri puta sa po 300 μ l pufera za ispiranje te dobro osušila lupkanjem pločice po papirnatom ubrusu. U jažice sam zatim dodala 100 μ l sekundarnog antitijela s konjugiranom peroksidazom, koji se tijekom 30 minuta vezao na primarno antitijelo. Pošto sam odstranila otopinu sa sekundarnim antitijelom i isprala jažice, dodala sam supstrat peroksidaze (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, TMB) te inkubirala tijekom 30 minuta na miješalici. Reakciju sam zaustavila dodavanjem 100 μ l otopine za zaustavljanje reakcije. Unutar 10 minuta od zaustavljanja reakcije, očitala sam vrijednosti apsorbancije pri 450 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Konstruirala sam baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o logaritmu koncentracije standarda, iz kojeg sam odredila koncentracije serotonina u uzorcima pomoću očitanih apsorbancija. Raspon koncentracija korištenih standarda dan je u Tablici 7.

Tablica 7. Koncentracije standarda serotonina korištenih u metodi ELISA.

oznaka standarda	koncentracija 5HT	
	ng/ml	nmol/l
A	0	0
B	0,015	0,085
C	0,05	0,28
D	0,15	0,85
E	0,5	2,8
F	2,5	14

3.2.10. Određivanje koncentracije dopamina i noradrenalina u uzorcima tkiva mozga metodom ELISA

Slično kao i kod određivanja koncentracija serotonina, koncentracije dopamina i noradrenalina u uzorcima tkiva mozga odredila sam pomoću kompleta 2CAT Research ELISA temeljenog na kompetitivnoj metodi ELISA. U ovom slučaju, prvi korak u metodi bila je zajednička ekstrakcija dopamina i noradrenalina. Jažicama u pločici za ekstrakciju s uzorcima, kontrolama i standardima dodala sam po 25 µl TE pufera, prekrila ih adhezivnom folijom i stavila na miješalicu pri sobnoj temperaturi. Nakon 60 minuta, odstranila sam sadržaj jažica i isprala ih u dva navrata pomoću pufera za ispiranje. Zatim sam jažicama dodala pufer za acilaciju (150 µl) te acilacijski reagens (25 µl) i ostavila pločicu na miješalici tijekom 20 minuta. Potom sam odstranila sadržaj jažica i dvaput ih isprala, nakon čega sam dodala 150 µl hidroklorne kiseline. Pločicu sam ostavila na miješalici, a nakon 10 minuta reakcije, pipetirala sam 140 µl uzorka, standarda i kontrola u jažice nove mikrotitarske pločice, kojima sam zatim dodala po 50 µl otopine enzima. Pločicu sam kratko protresla i potom stavila u inkubator na +37 °C, u kojem sam pločicu ostavila na 2 sata.

U daljnjim postupcima, koristila sam zasebnu pločicu za dopamin, odnosno, noradrenalin. Iz mikrotitarske pločice u kojoj se odvijala enzimatska reakcija, pipetirala sam po 90 µl uzorka, standarda i kontrola u jažice tzv. enzimskih pločica. U jažice pločice za analizu dopamina pipetirala sam zatim 50 µl antiseruma s antitijelom za dopamin. Isto sam napravila i za pločicu za analizu noradrenalina. Pločice sam tijekom 20 h ostavila u hladnjaku na +4 °C. Nakon inkubacije, odstranila sam sadržaj jažica nakon čega sam ih isprala četiri puta s 300 µl pufera za ispiranje. Zatim sam u jažice dodala 100 µl enzimskog konjugata, prekrila ih folijom te ostavila 30 minuta na miješalici pri sobnoj temperaturi. Jažice sam ponovno isprala četiri puta s 300 µl pufera za ispiranje kako bih odstranila sav nevezani enzimski konjugat, nakon čega sam dodala po 100 µl supstrata u svaku jažicu. Pločicu sam zamotanu u foliju ostavila 30 minuta na miješalici, a reakciju sam potom prekinula dodavanjem 25 µl otopine za zaustavljanje reakcije. Apsorbanciju sam očitala pri 450 nm, a iz baždarnih pravaca ovisnosti apsorbancije o logaritmu koncentracije standarda, odredila sam koncentracije dopamina i noradrenalina. Raspon korištenih standarda dan je u Tablici 8.

Tablica 8. Koncentracije standarda dopamina i noradrenalina korištenih u metodi ELISA.

oznaka standarda	koncentracija (ng/ml)		koncentracija (nmol/l)	
	DA	NA	DA	NA
A	0	0	0	0
B	0,5	0,2	3,3	1,2
C	1,5	0,6	9,8	3,5
D	5	2	33	12
E	20	8	131	47
F	80	32	522	189

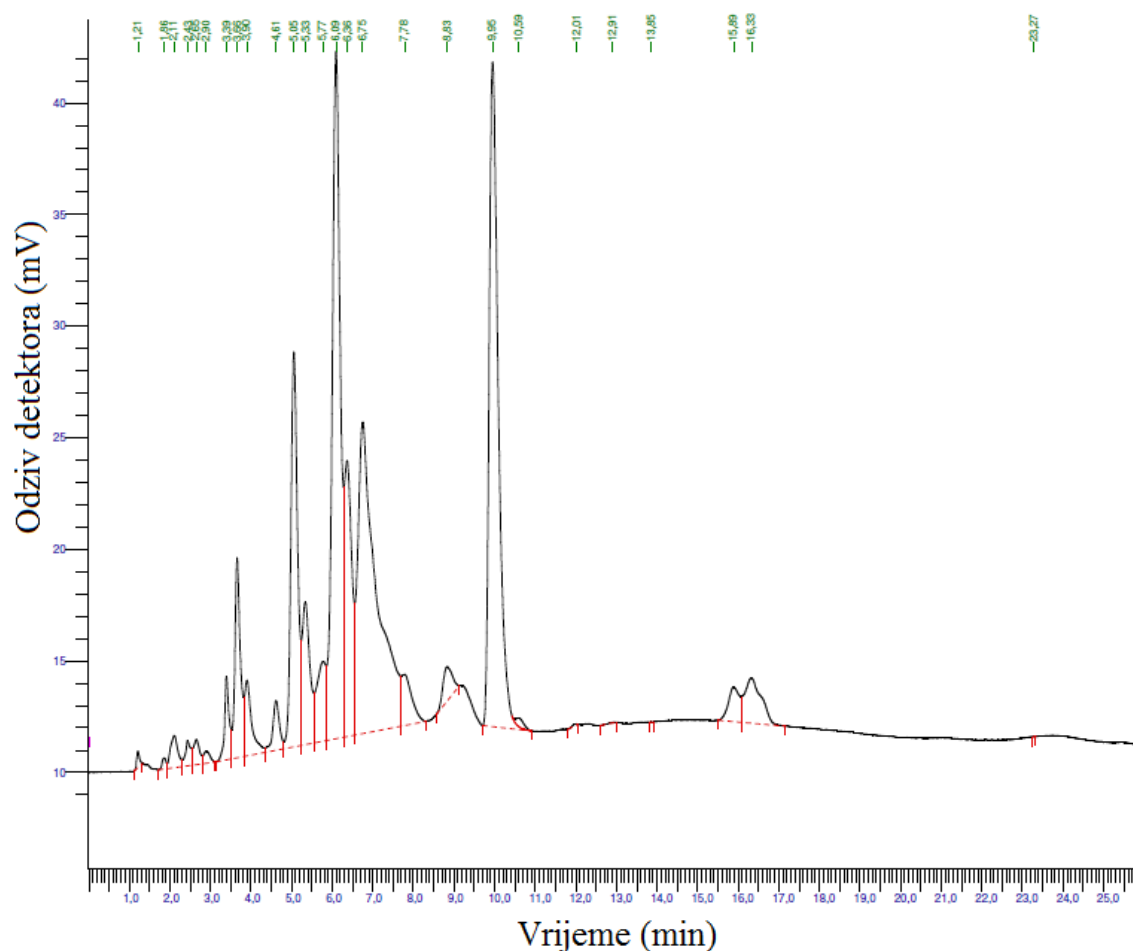
3.2.11. Statistička obrada podataka

U tabličnim prikazima dobivenih koncentracija koristila sam srednju vrijednost (*engl.* mean, M) i standardnu devijaciju (*engl.* standard deviation, SD). Vrijednosti koncentracija serotonina, dopamina i noradrenalina dobivenih metodama HPLC i ELISA usporedila sam u programu GraphPad Prism 7. Za određivanje pravilnosti distribucije rezultata koristila sam Shapiro-Wilk test. U analizi korelacije, parametre koji su pokazivali pravilnu distribuciju analizirala sam Pearson testom, dok sam one koji su pokazivali nepravilnu distribuciju analizirala Spearman testom. U rezultatima sam prikazala dobivene parametre testa korištenog za usporedbu koncentracija dobivenih metodama HPLC i ELISA. Vrijednosti koncentracija koje su od prosjeka odstupale više od dvije standardne devijacije nisam uključila u usporedbu.

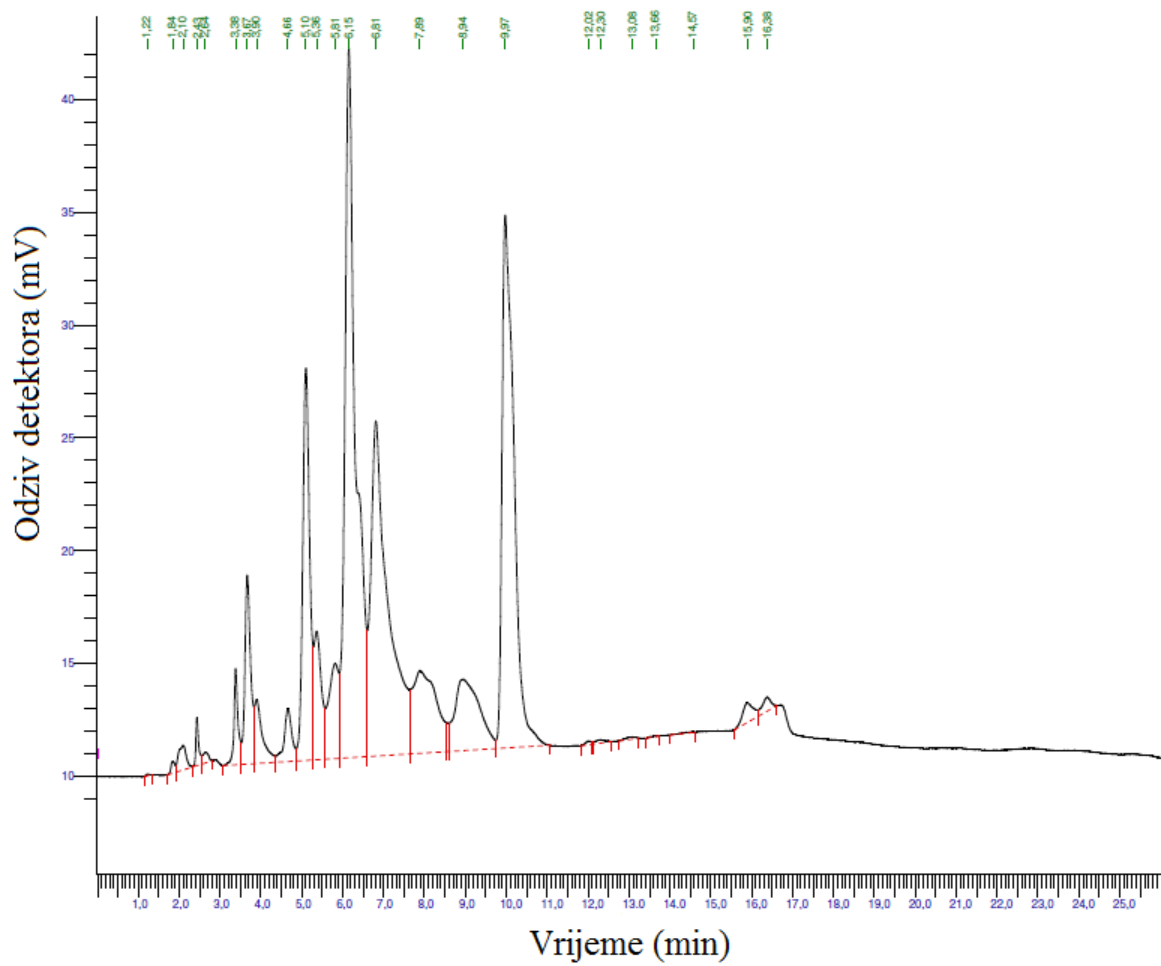
4. Rezultati

4.1. Utjecaj filtracije na razlučivost pikova

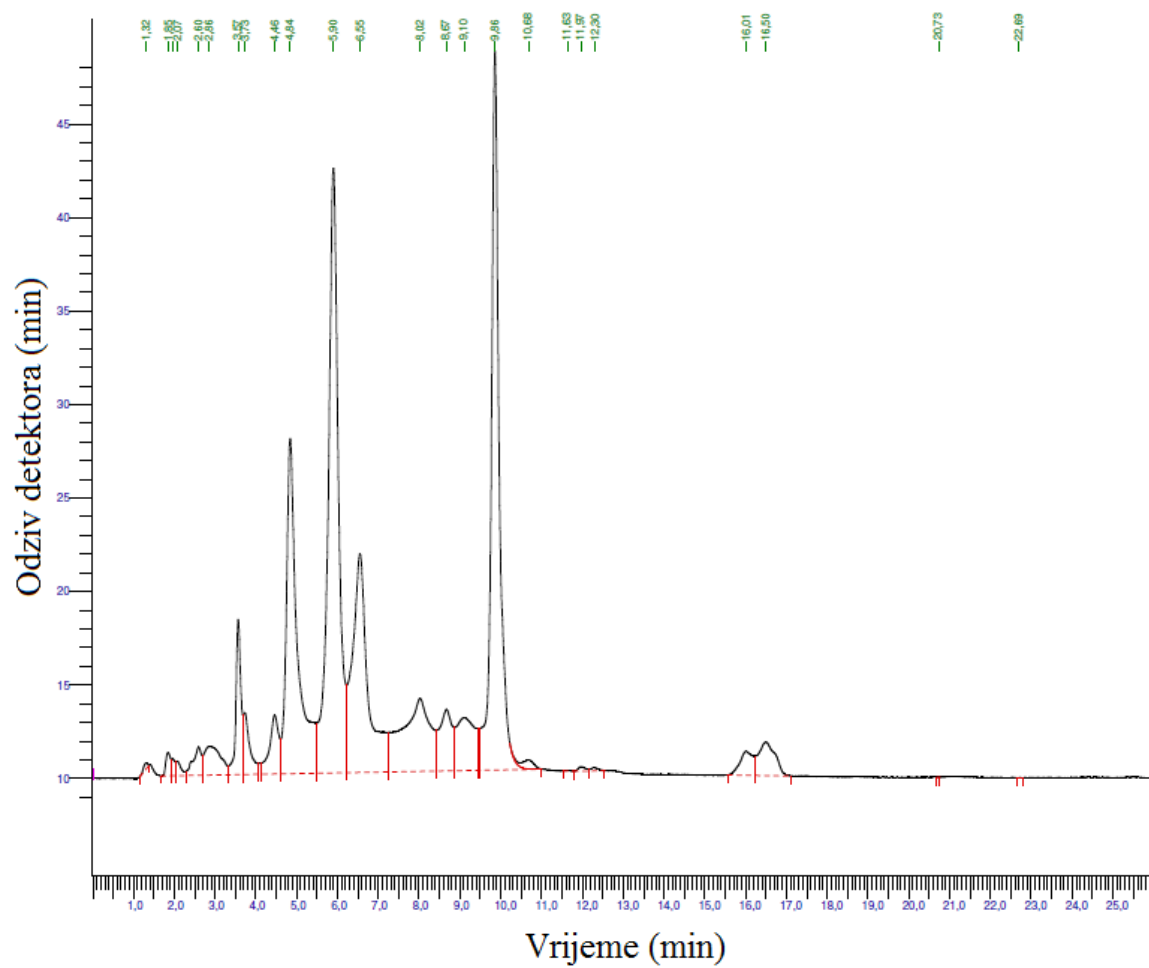
Priloženi kromatogrami (Slike 11-13) ilustriraju ispitivanje utjecaja filtriranja te centrifugiranja u dva koraka na razlučivost pikova na kromatogramu. Između kromatograma dobivenih nakon prvog koraka centrifugiranja te onog dobivenog nakon filtriranja nema velike razlike u izgledu, dok kromatogram dobiven nakon ponovljenog koraka centrifugiranja pokazuje bolje razlučivanje pikova. Stoga je u pripremi daljnjih uzoraka filtracija izostavljena i zamijenjena dodatnim korakom centrifugiranja.



Slika 11. Kromatogram probnog uzorka tkiva mozga nakon prvog koraka centrifugiranja.



Slika 12. Kromatogram probnog uzorka tkiva mozga nakon filtriranja kroz filter veličina pora 0,22 μm .



Slika 13. Kromatogram probnog uzorka tkiva mozga nakon drugog koraka centrifugiranja.

4.2. *Razvoj metode*

4.2.1. *Izokratna metoda*

Kao polazna točka u razvoju metode, odabrana je metoda izokratne elucije s 0,05% mravljom kiselinom (HCOOH) i acetonitrilom (ACN) u omjeru 90:10, prema radu Thomasa i sur. (2015). Početni uvjeti u razvoju metode bili su sljedeći:

ispiranje: 90% HCOOH, 10% ACN (5 min)

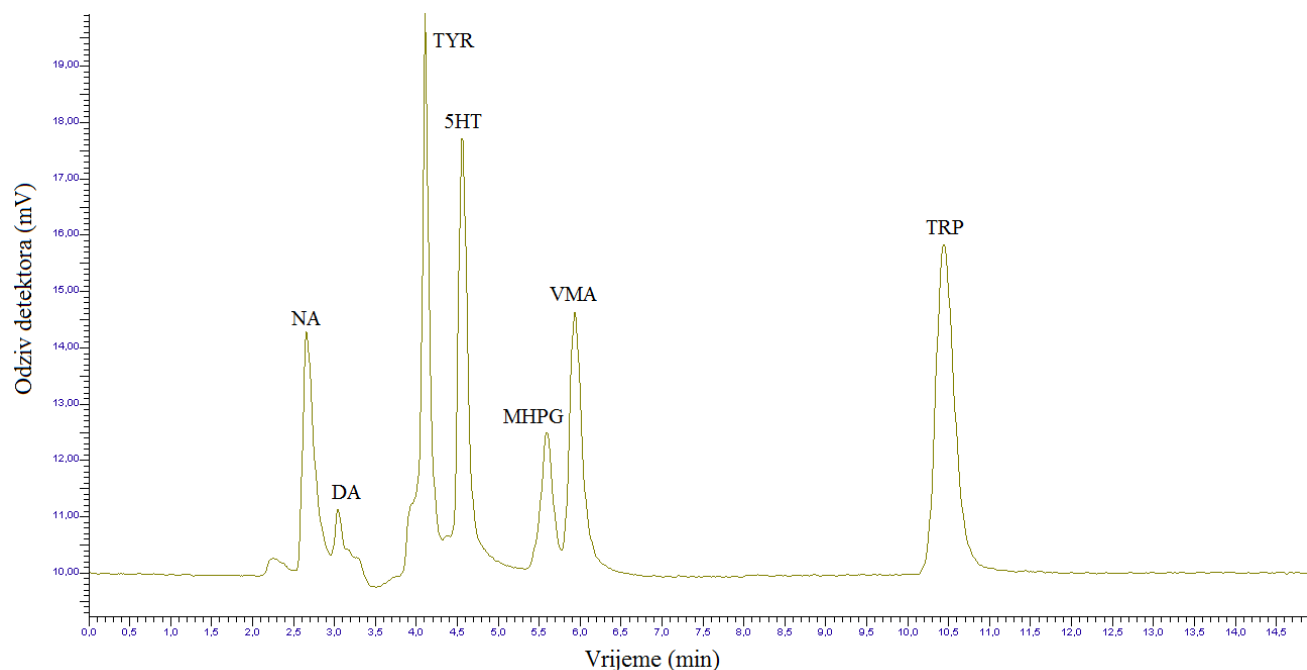
metoda: 90% HCOOH, 10% ACN

trajanje metode: 15 min

protok: 0,5 ml/min

volumen injektiranja: 40 μ l

Kromatogram smjese standarda 5HT, DA, NA, TRP, TYR, 5HIAA, MHPG, VMA i HVA (s konačnom koncentracijom svake komponente od 5 nM) testirane prema opisanoj izokratnoj metodi prikazan je na Slici 14. Na kromatogramu se ne vide 5HIAA i HVA jer pri izokratnoj metodi s udjelom organske faze od 10% imaju retencijsko vrijeme dulje od 15 minuta. Budući da izokratna elucija nije zadovoljavajuće razdvojila standarde u smjesi, metodu sam nastavila modificirati s gradijentnim načinom elucije.



Slika 14. Kromatogram smjese standarda serotonina (5HT), dopamina (DA), noradrenalina (NA), triptofana (TRP), tirozina (TYR), 5-hidroksiindol-octene kiseline (5HIAA), 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola (MHPG), homovanilične kiseline (HVA) i vanililmandelične kiseline (VMA) razdvojene prema početnoj izokratnoj metodi.

4.2.2. Početna gradijentna metoda

Gradijent sam raspodijelila u dva koraka s različitim nagibom, odnosno, promjenom udjela organske faze u danom vremenu (Tablica 9). Treći korak u metodi predstavlja spuštanje udjela acetonitrila na 2%, a četvrti korak, s izokratnom elucijom, služi kao priprema za ispiranje između pojedinih ispitivanja. Protok je bio 0,5 ml/min u koraku ispiranja, a 0,7 ml/min tijekom ostalih koraka. Volumen injektiranja iznosio je 50 μ l.

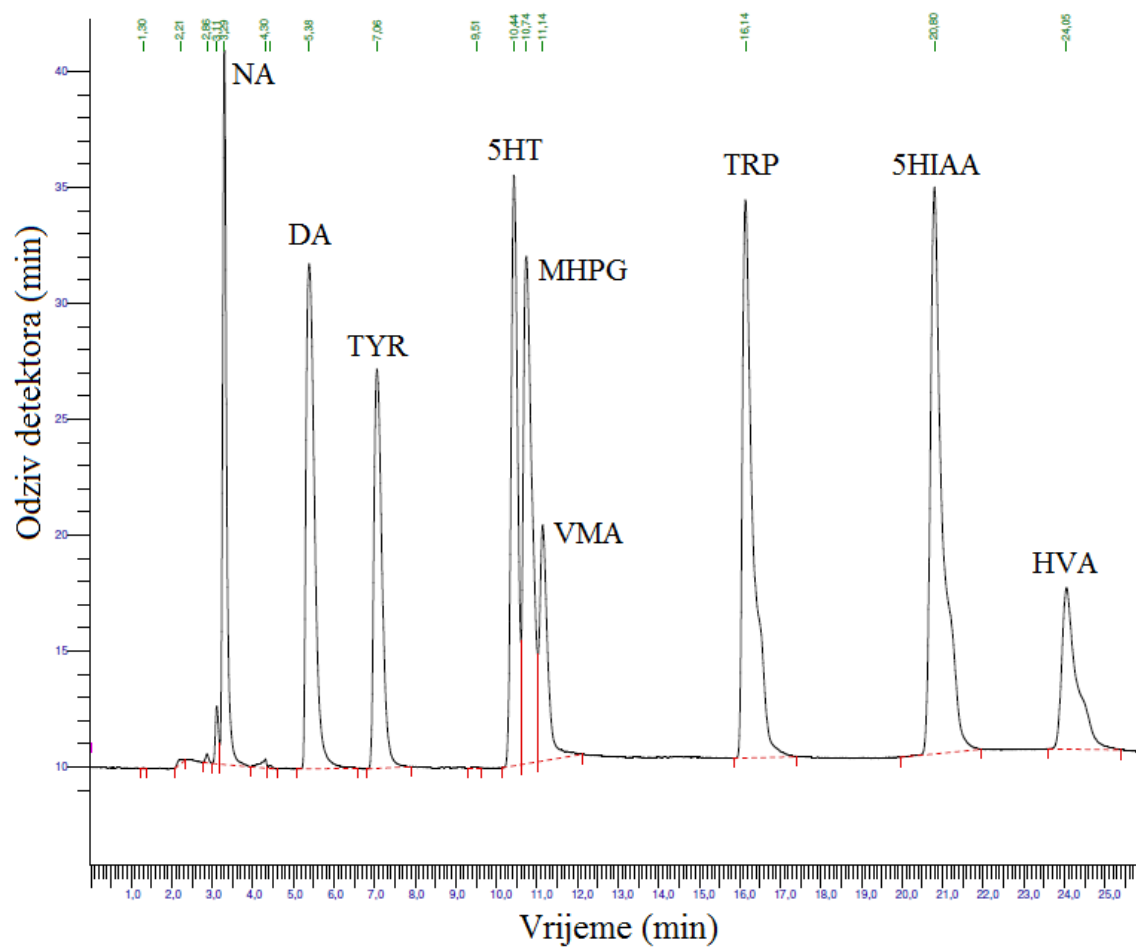
Tablica 9. Promjena udjela vodene i organske faze u pojedinim koracima početne gradijentne metode.

korak	trajanje	udio vodene ili organske faze (%)		način elucije	nagib gradijenta*
		0,05% HCOOH	acetonitril		
0**	8 min	98	2	izokratni	-
1	10 min	90	10	gradijentni	0,8
2	5 min	85	15	gradijentni	1
3	1 min	98	2	gradijentni	-13
4	5 min	98	2	izokratni	-

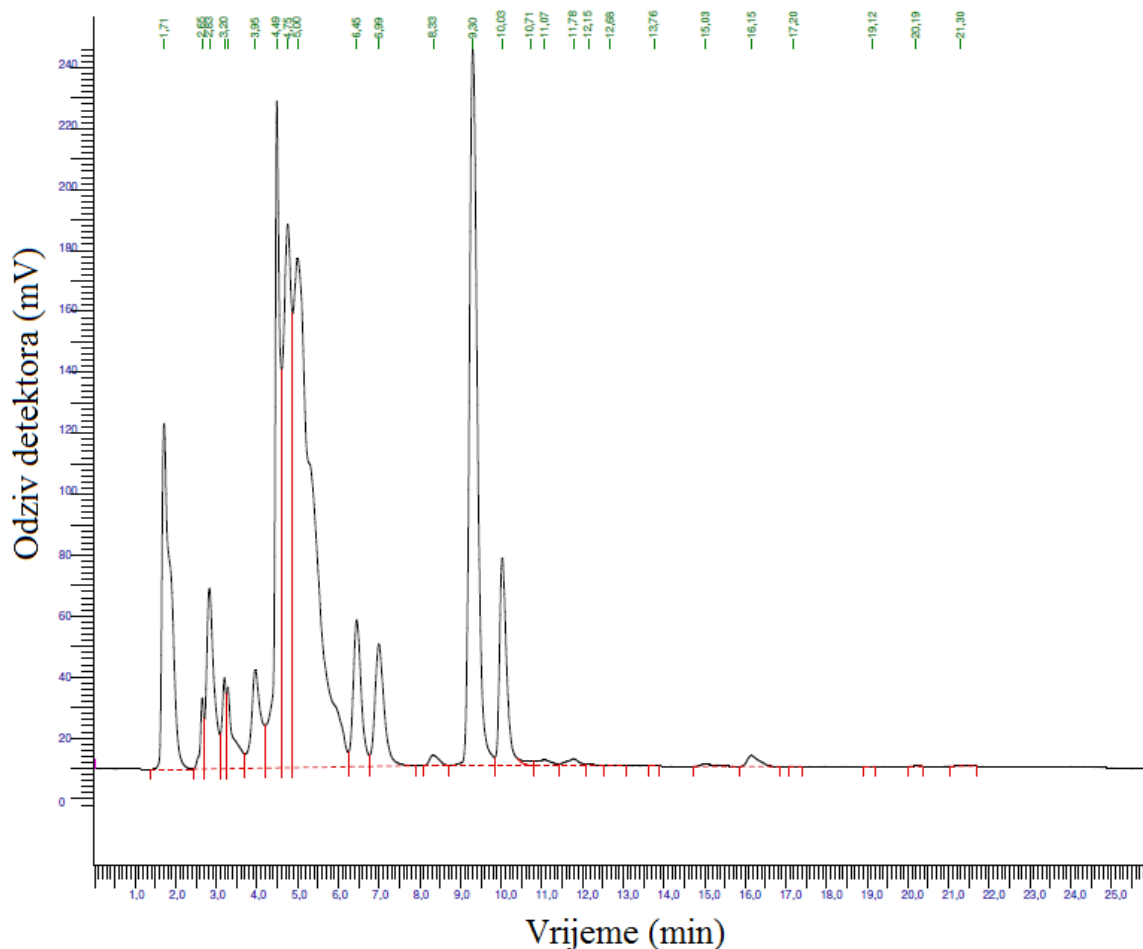
* Nagib gradijenta izračunat je kao promjena u udjelu organske faze kroz vremenski period trajanja koraka.

** Nulti korak metode predstavlja ispiranje kolone između uzastopnih ispitivanja i nije prikazan na kromatogramima.

U nastavku su prikazani kromatogrami smjese standarda (Slika 15) te prvog probnog uzorka tkiva mozga (Slika 16), testirani prema ovdje opisanoj gradijentnoj metodi. Koncentracije svih komponenata smjese standarda bile su 31,25 nM.



Slika 15. Kromatogram smjese standarda serotonina (5HT), dopamina (DA), noradrenalina (NA), triptofana (TRP), tirozina (TYR), 5-hidroksiindol-octene kiseline (5HIAA), 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola (MHPG), homovanilične kiseline (HVA) i vanililmandelične kiseline (VMA) razdvojene prema početnoj metodi s dva gradijentna koraka.



Slika 16. Kromatogram prvog analiziranog uzorka mozga. Uzorak je analiziran prema početnoj metodi s dva gradijentna koraka.

Gradijentan način elucije, sa smanjenim udjelom organske faze i povećanom brzinom protoka, omogućio je bolje razdvajanje pikova u odnosu na razdvajanje u izokratnoj metodi. Kako uvjeti u početnoj gradijentnoj metodi ipak nisu omogućili dobro razdvajanje serotonina od 3-metoksi-4-hidroksifenilglikola u smjesi standarda, te nisu pokazali zadovoljavajuće razdvajanje pikova pri retencijskim vremenima gdje su očekivani dopamin i noradrenalin u uzorku tkiva mozga, u nastavku razvoja metode promijenjen je udio organske faze, te ujednačen protok kroz sve korake metode. Utjecaj različitih nagiba gradijenta ispitan je kroz promjenu trajanja metode i udjela organske faze. Također, ispitani su i različiti volumeni injektiranja.

4.3. Odabrana metoda

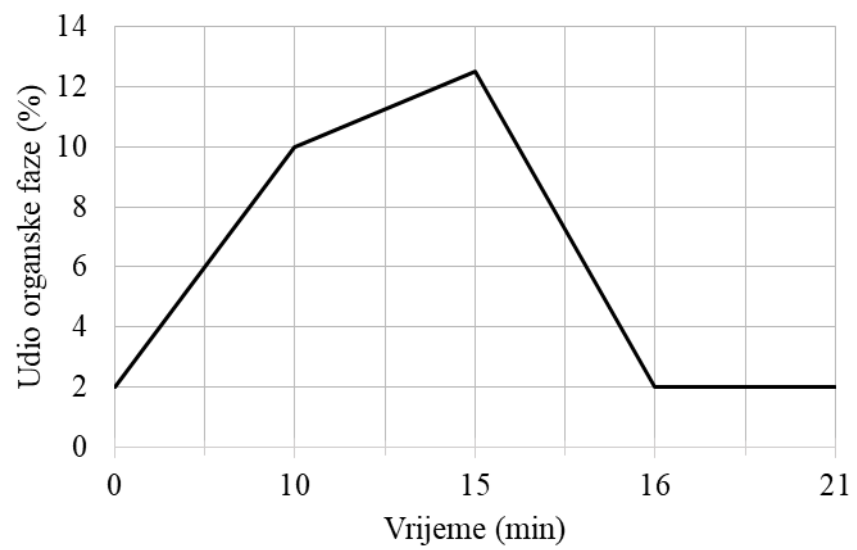
Najbolje razdvajanje pokazala je metoda s dva gradijentna koraka u kojima organska faza doseže maksimalni udio od 12,5% (Tablica 10, Slika 17). Kao i u početnoj gradijentnoj metodi, zadržan je korak spuštanja udjela organske faze na 2% s kratkim korakom izokratne elucije pri istom udjelu organske faze, kao priprema za ispiranje kolone između ispitivanja. Protok u odabranoj metodi je 0,7 ml/min u svim koracima (uključujući i korak ispiranja), a volumen injektiran u kolonu iznosi 20 µl. Dani su primjeri kromatograma smjese standarda serotonina, dopamina i noradrenalina (Slika 18), te uzorka tkiva mozga (Slika 19) analizirani prema odabranoj metodi.

Tablica 10. Promjena udjela vodene i organske faze u pojedinim koracima odabrane metode.

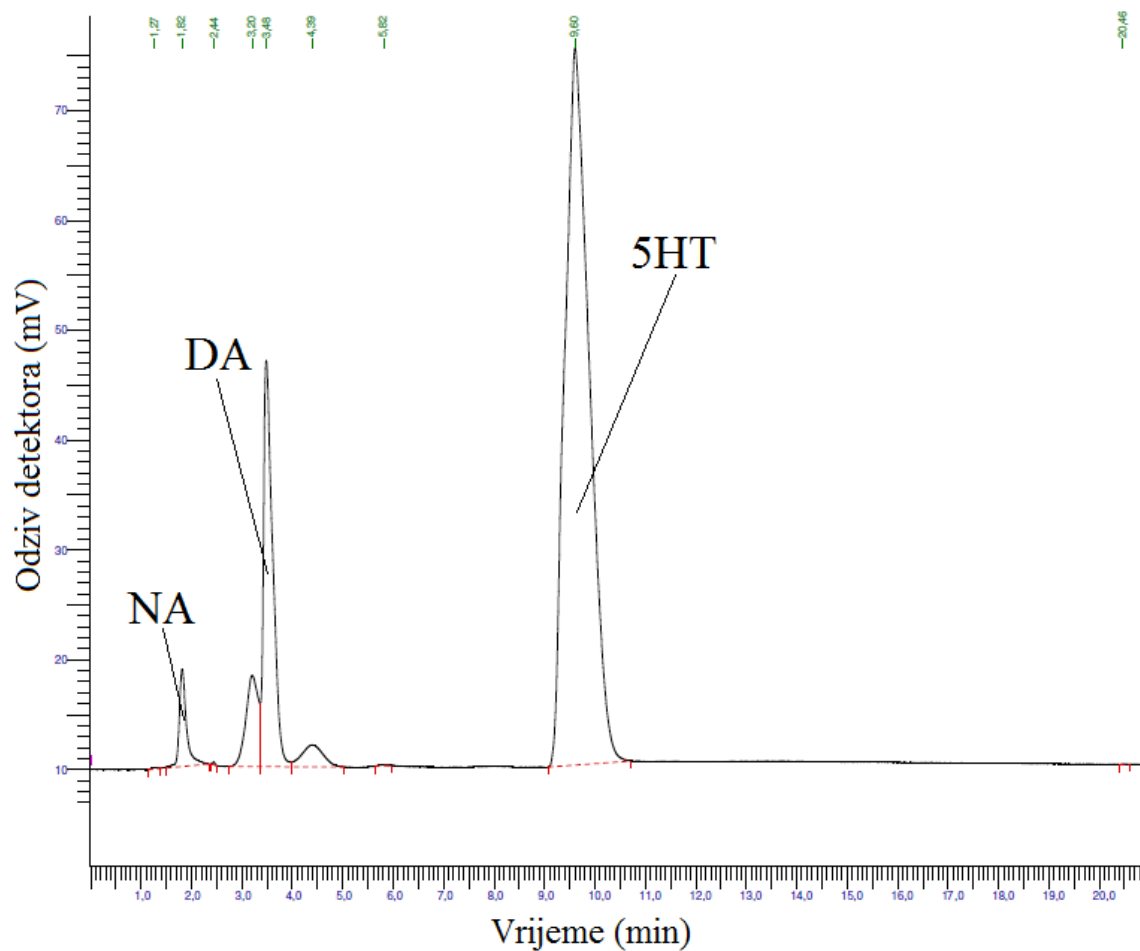
korak	trajanje	udio vodene ili organske faze (%)		način elucije	nagib gradijenta*
		0,05% HCOOH	acetonitril		
0**	5 min	98	2	izokratni	-
1	10 min	90	10	gradijentni	0,8
2	5 min	87,5	12,5	gradijentni	0,5
3	1 min	98	2	gradijentni	-9,5
4	5 min	98	2	izokratni	-

* Nagib gradijenta izračunat je kao promjena u udjelu organske faze kroz vremenski period trajanja koraka.

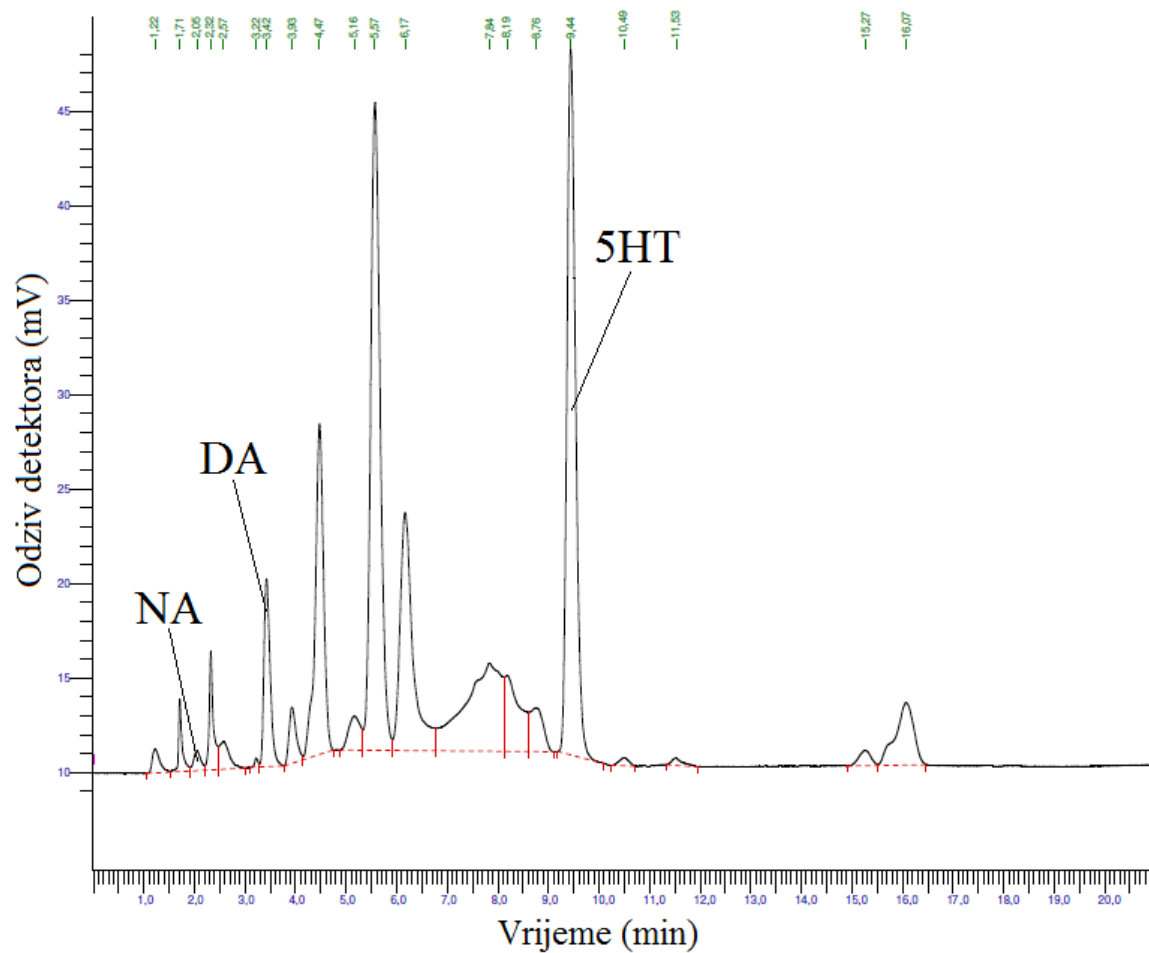
** Nulti korak metode predstavlja ispiranje kolone između uzastopnih ispitivanja i nije prikazan na kromatogramima.



Slika 17. Grafički prikaz promjene udjela organske faze u vremenu u odabranoj metodi.



Slika 18. Kromatogram smjese standarda serotonina (5HT, 1250 nM), dopamina (DA, 50 nM) i noradrenalina (NA, 25 nM) dobiven odabranom metodom.



Slika 19. Kromatogram uzorka tkiva mozga dobiven odabranom metodom. Na kromatogramu su označeni pikovi serotonina (5HT), dopamina (DA) i noradrenalina (NA).

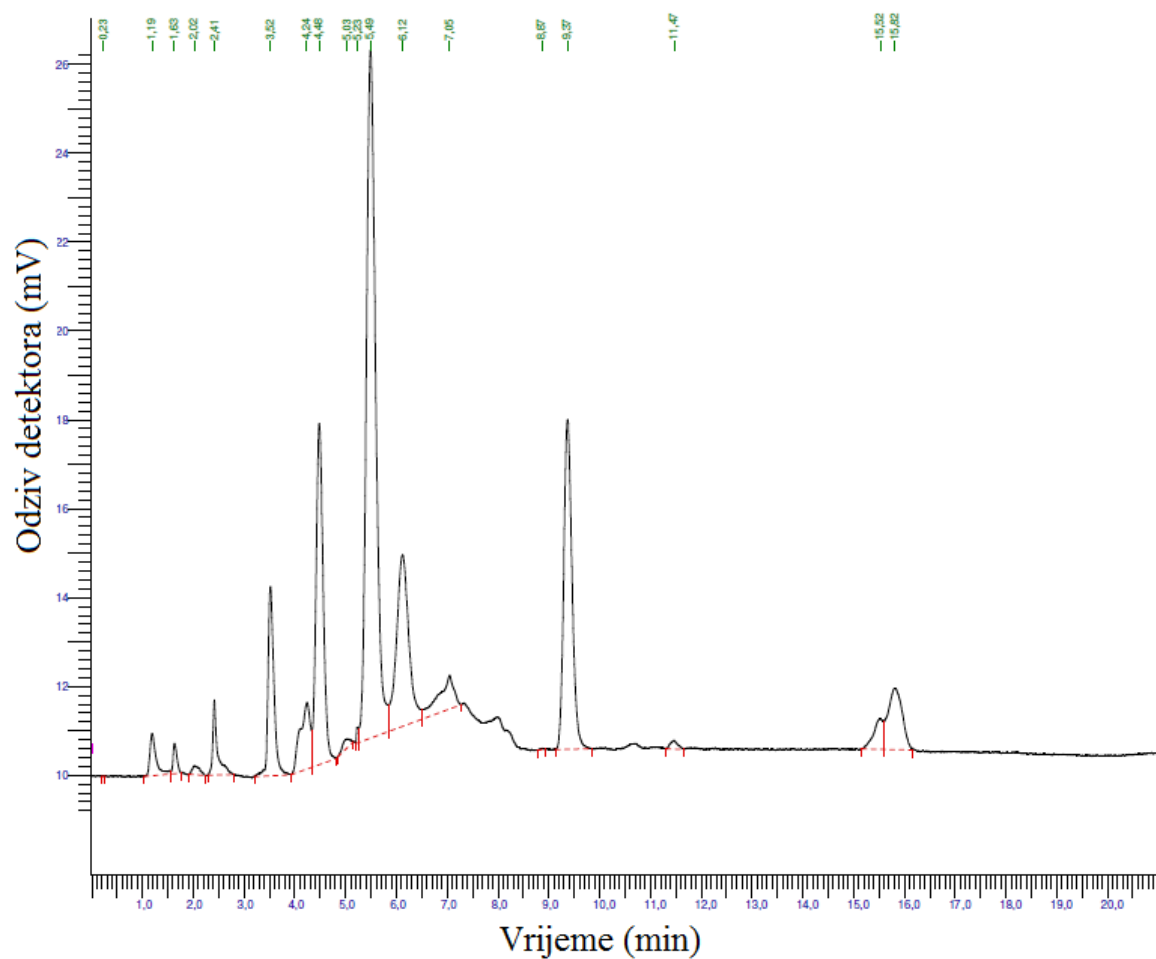
Prosječna retencijska vremena sa standardnim devijacijama za serotonin, dopamin i noradrenalin u odabranoj metodi određena su iz 7 standardnih otopina i 7 analiziranih uzorka tkiva mozga, a prikazana su u Tablici 11.

Tablica 11. Prosječno (*engl.* mean, M) retencijsko vrijeme sa standardnom devijacijom (SD) za serotonin, dopamin i noradrenalin u smjesi standarda i uzorku tkiva mozga.

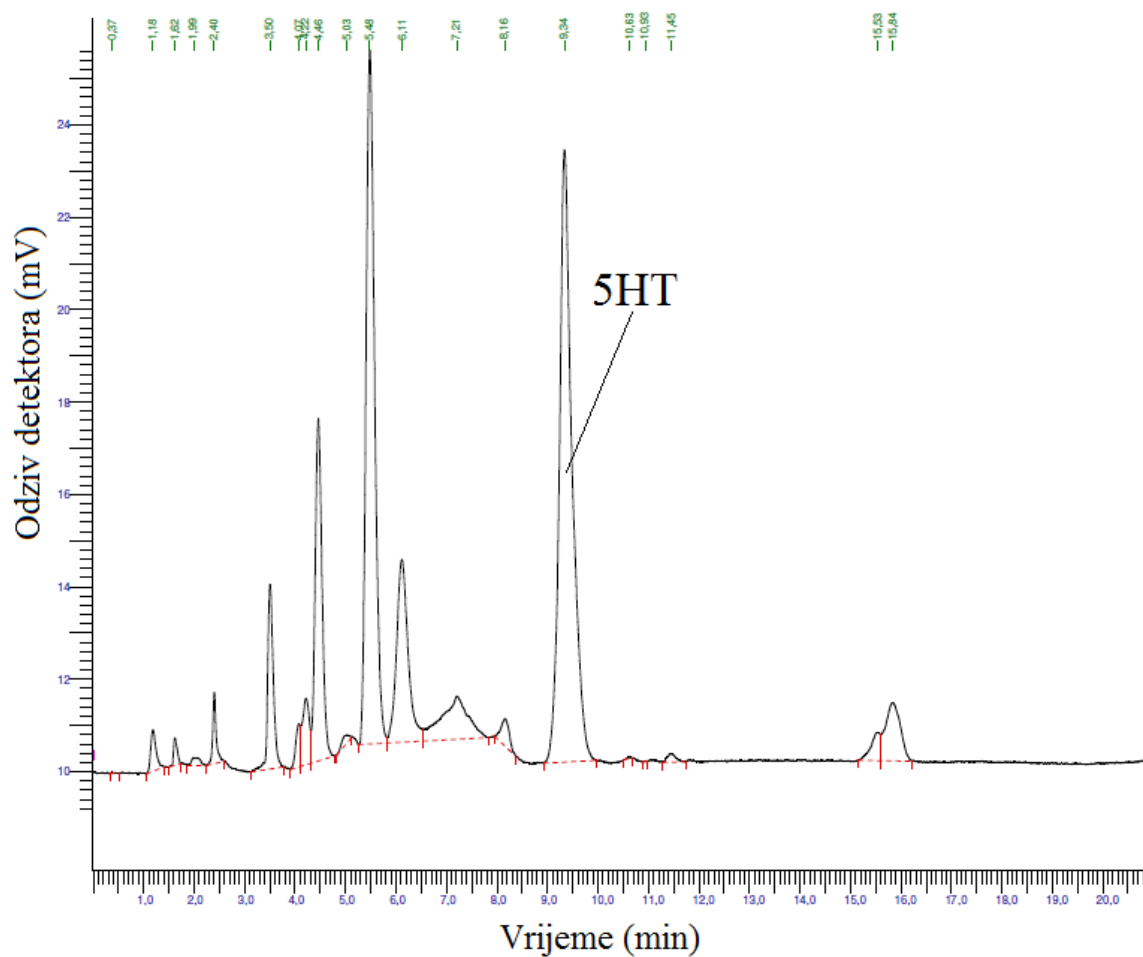
	retencijsko vrijeme (min), M \pm SD		
	5HT	DA	NA
smjesa standarda	9,44 \pm 0,48	3,39 \pm 0,12	1,78 \pm 0,05
uzorak	9,67 \pm 0,26	3,57 \pm 0,14	2,11 \pm 0,05

4.4. Identifikacija pikova na kromatogramu uzorka tkiva mozga

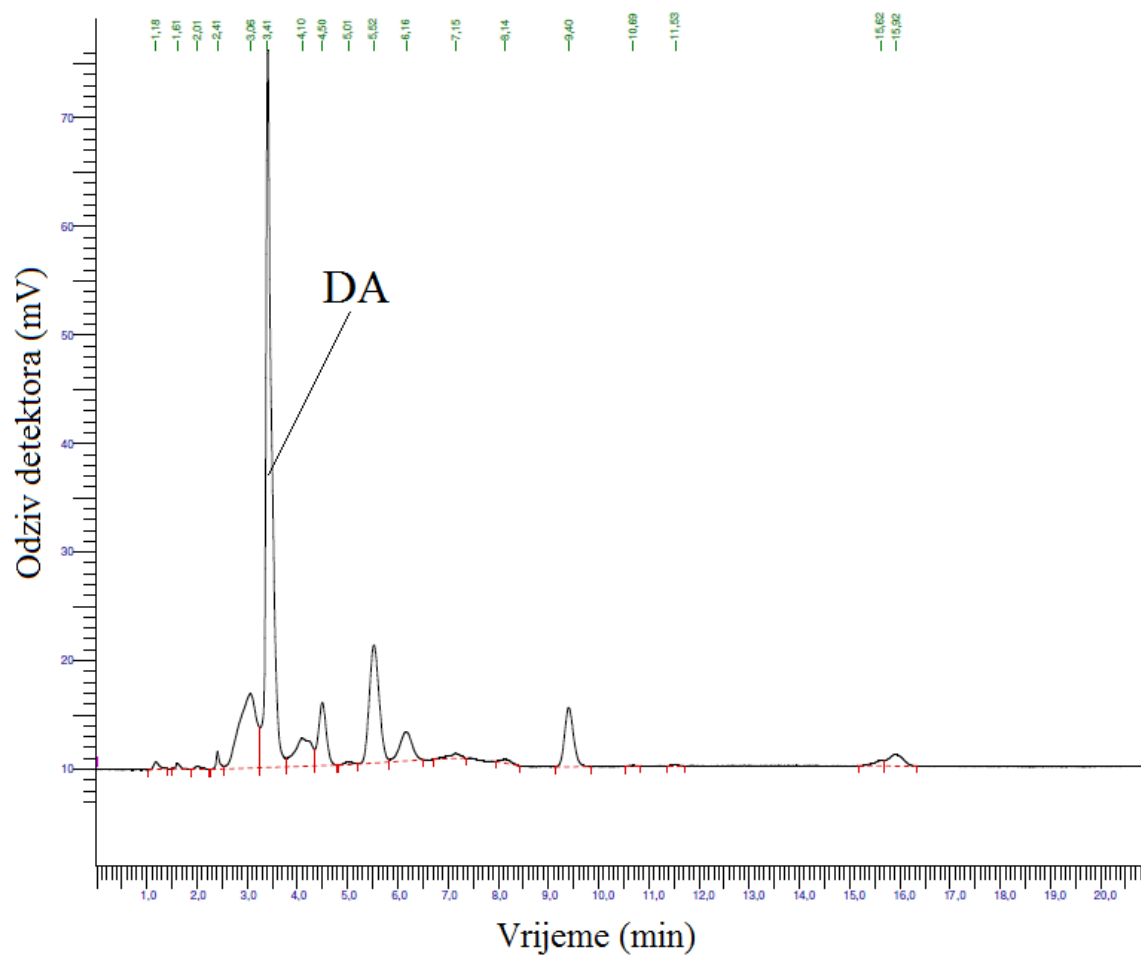
Na sljedećim kromatogramima (Slike 20-23) prikazana je identifikacija pikova serotoninina, dopamina i noradrenalina u uzorku tkiva mozga metodom dodavanja vanjskog standarda. Za usporedbu je dan kromatogram ispitivanog uzorka bez dodanih vanjskih standarda, te kromatogrami istog uzorka s dodanim jednim od vanjskih standarda. Usporedbom kromatograma alikvota uzorka tkiva mozga bez dodanog vanjskog standarda s onim gdje je dodan vanjski standard serotoninina, povećanje pika pri retencijskom vremenu od 9,3 min ukazuje na to da taj pik pripada serotoninu. Na sličan način povećanje pika pri retencijskom vremenu od 3,41 min ukazuje na prisutnost dopamina, dok je pri retencijskom vremenu od 1,79 min određen pik noradrenalina.



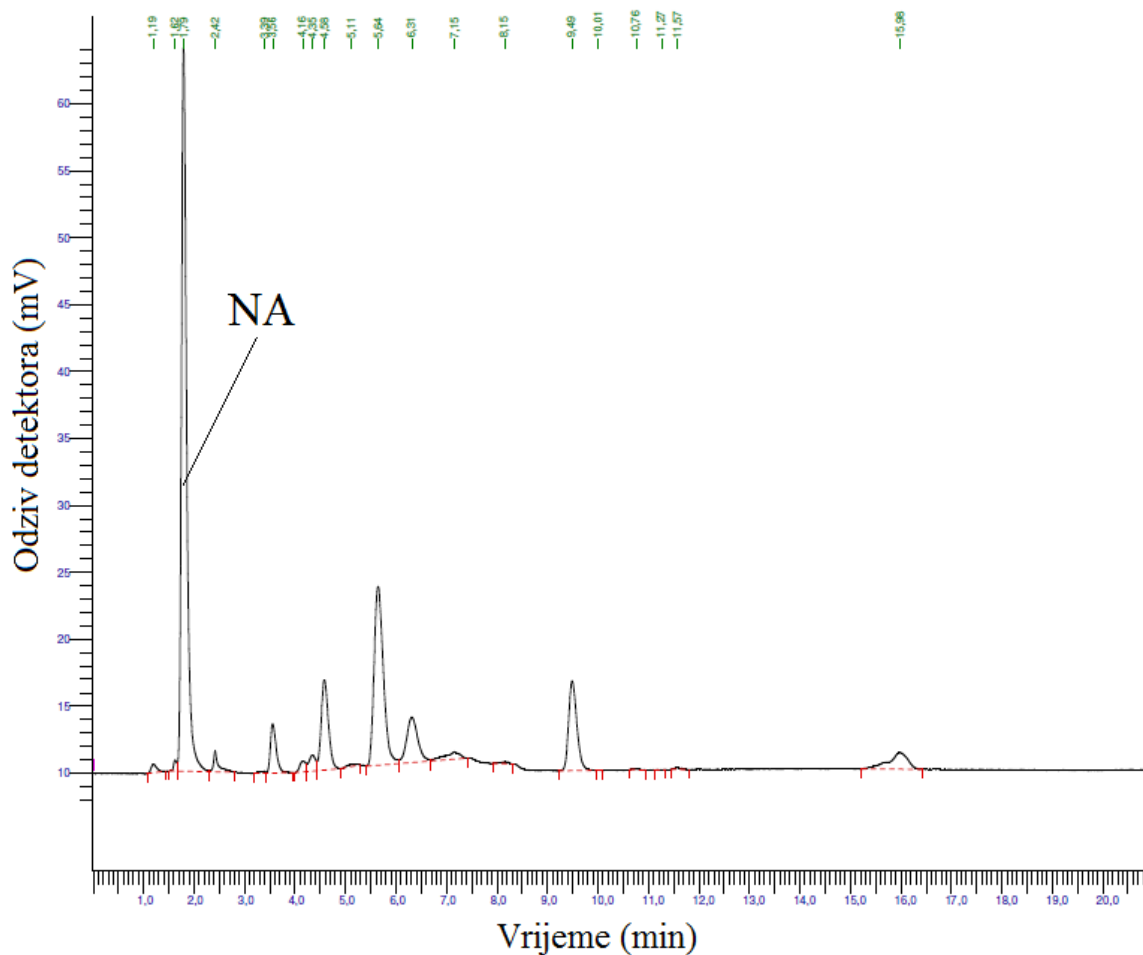
Slika 20. Kromatogram uzorka tkiva mozga korištenog za identifikaciju pikova serotonina, dopamina i noradrenalina. Prikazan je alikvot uzorka bez dodanog vanjskog standarda.



Slika 21. Kromatogram uzorka tkiva mozga s dodanim vanjskim standardom serotonina.



Slika 22. Kromatogram uzorka tkiva mozga s dodanim vanjskim standardom dopamina.



Slika 23. Kromatogram uzorka tkiva mozga s dodanim vanjskim stadardom noradrenalina.

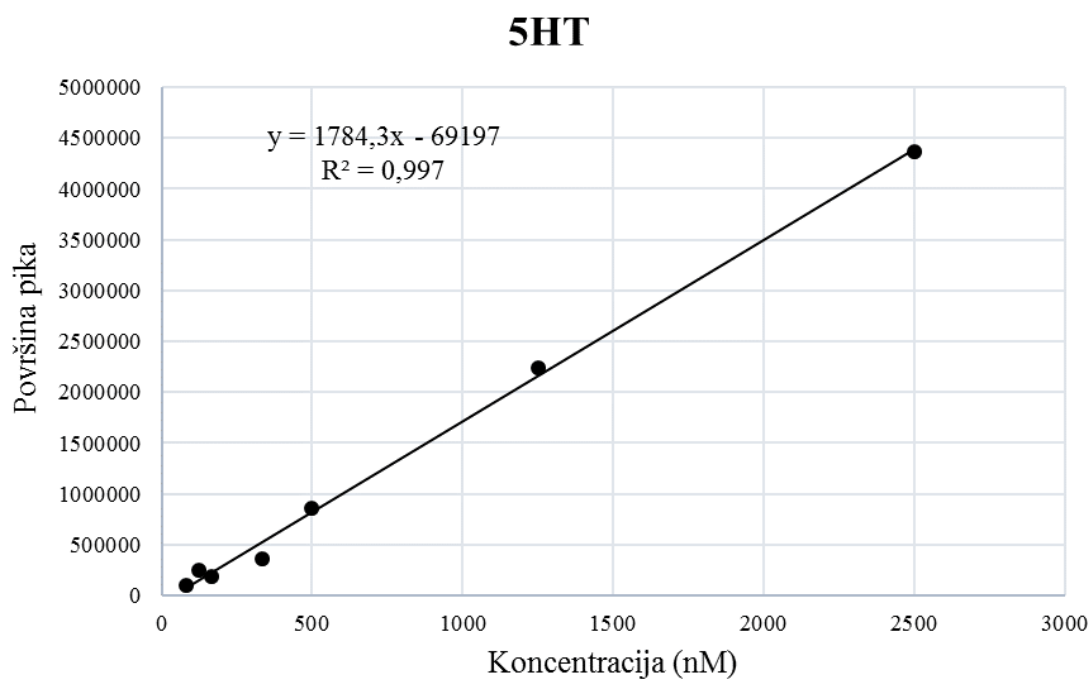
4.5. Validacija metode

4.5.1. Selektivnost

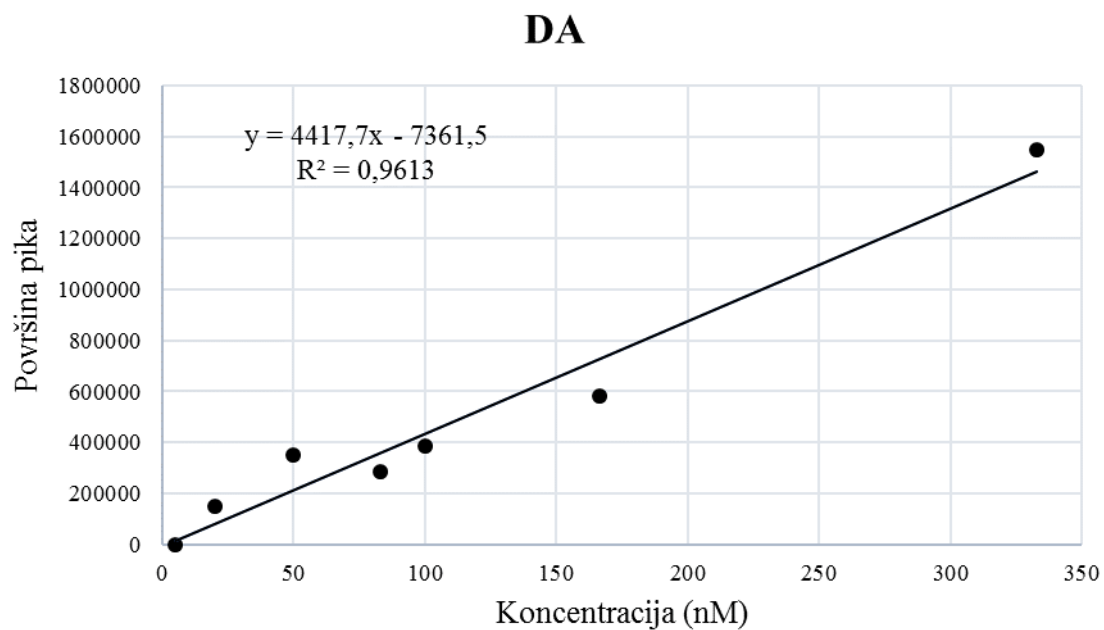
Primjeri kromatograma smjese standarda (Slika 18) i uzorka tkiva mozga (Slika 19) testiranih prema odabranoj metodi pokazuju dobro razlučivanje pikova serotonina, dopamina i noradrenalina od okolnih pikova, odnosno, ukazuju na dobru selektivnost metode.

4.5.2. Linearnost

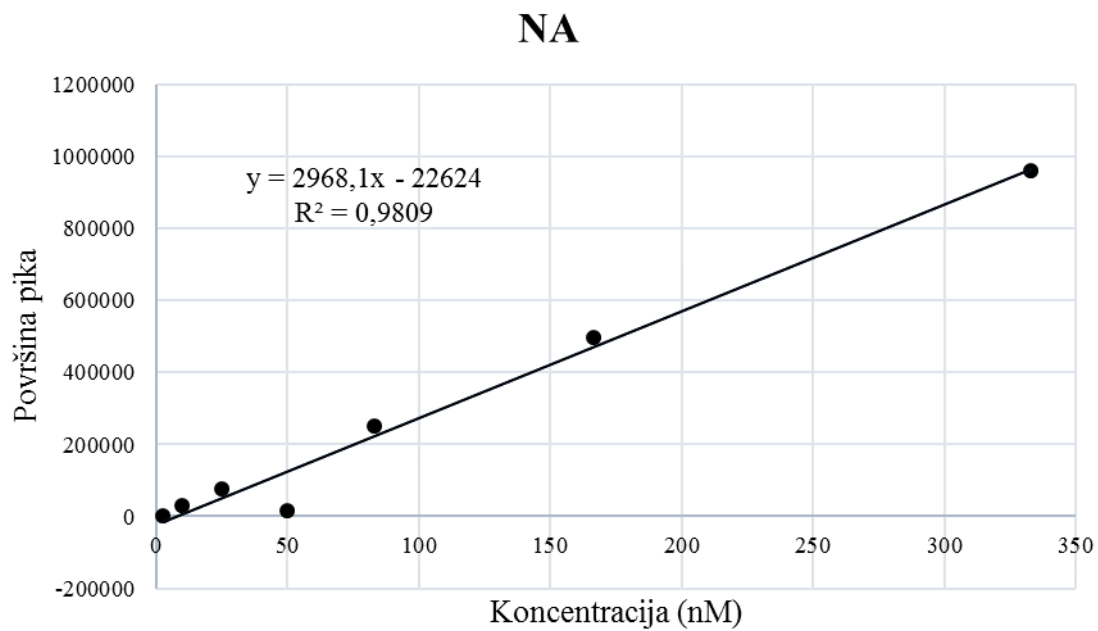
Baždarni pravci ovisnosti površine pika o koncentraciji standarda (Slike 24-26) pokazali su dobru linearnost odabrane metode za serotonin ($R^2 > 0,99$), te nešto lošiju za dopamin i noradrenalin ($R^2 > 0,95$).



Slika 24. Baždarni pravac ovisnosti površine pika o koncentraciji standarda serotonina.



Slika 25. Baždarni pravac ovisnosti površine pika o koncentraciji standarda dopamina.



Slika 26. Baždarni pravac ovisnosti površine pika o koncentraciji standarda noradrenalina.

4.5.3. Ponovljivost

Ponovljivost metode unutar istog dana bila je dobra za sve analite, s maksimalnim odstupanjem rezultata za noradrenalin od 1,34%. Dok je ponovljivost metode između različitih dana za serotonin ostala dobra s odstupanjem od 2,3%, rezultati ukazuju na slabu ponovljivost metode između različitih dana za dopamin (13,33%), te nešto bolju za noradrenalin (4,66%) (Tablica 12).

Tablica 12. Ponovljivost metode izražena kao postotak relativne standardne devijacije (RSD) površine pikova.

ponovljivost	RSD (%), n=3		
	5HT	DA	NA
unutar dana	0,62	1,04	1,34
između dana	2,30	13,33	4,66

4.6. Koncentracije serotonina, dopamina i noradrenalina dobivene metodama HPLC i ELISA

Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracija serotonina, dopamina i noradrenalina dobivenih metodama HPLC i ELISA prikazane su u Tablici 13. Prosječne vrijednosti koncentracija serotonina i dopamina dobivenih metodom HPLC bile su veće od onih dobivenih metodom ELISA, dok je prosječna koncentracija noradrenalina dobivena metodom HPLC bila manja od one dobivene metodom ELISA.

Tablica 13. Koncentracije serotonina, dopamina i noradrenalina u uzorku tkiva mozga štakora – prefrontalnoj kori (engl. prefrontal cortex, PFC) - dobivene odabranom metodom HPLC te metodom ELISA.

	koncentracija ($M \pm SD$ u ng/g PFC), $n=7^*$		
	5HT	DA	NA
HPLC	426,07 \pm 45,95	34,43 \pm 2,36	19,19 \pm 2,99
ELISA	82,03 \pm 45,00	19,58 \pm 18,85	85,96 \pm 66,88

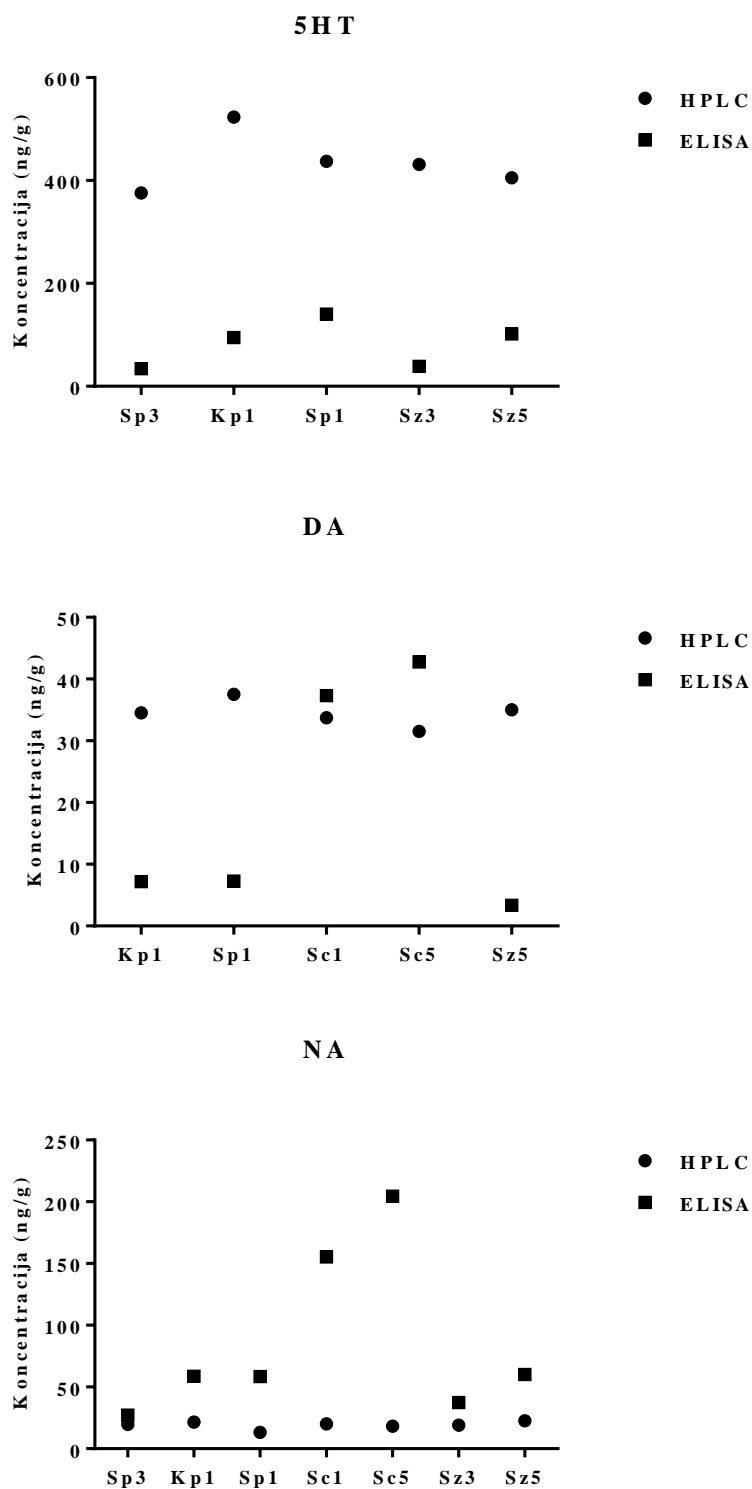
* osim za 5HT i DA ELISA ($n=5$)

4.7. Usporedba metoda HPLC i ELISA

Usporedba rezultata dobivenih metodama HPLC i ELISA neparametrijskim Spearman testom nije pokazala postojanje korelacije između rezultata ovih dviju metoda za svaki pojedini analit. Dobiveni parametri Spearman testa prikazani su u Tablici 5, a na Slici 17 grafički su prikazani odnosi između rezultata dobivenih metodama HPLC i ELISA za svaki uzorak.

Tablica 14. Parametri Spearman testa dobiveni u usporedbi rezultata metoda HPLC i ELISA: koeficijent korelacije (r), stupanj značajnosti (p) i broj uspoređivanih uzoraka (n).

	5HT	DA	NA
r	0,500	-0,700	0,143
p	0,450	0,233	0,783
n	5	5	7



Slika 27. Grafička usporedba rezultata dobivenih metodama HPLC i ELISA. Kratice na osi x odgovaraju oznakama pojedinih testiranih uzoraka tkiva mozga.

5. Rasprava

5.1. Razvoj i validacija metode

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti i validirati metodu HPLC za određivanje razina serotonina, dopamina i noradrenalina u uzorku tkiva mozga štakora. Razvijena metoda pokazala je dobro razdvajanje traženih analita, a budući da su eluirani unutar 10 minuta, zadovoljila je i kriterij kratkog trajanja, što će ovu metodu činiti pogodnom za analizu velikog broja uzoraka.

U početku razvoja metode, odabrani su uvjeti prema Thomasu i sur. (2015), koji su koristili jednostavnu izokratnu metodu s 10% acetonitrilom u 0,05% mravljoj kiselini za analizu noradrenalina i serotonina u uzorcima tkiva mozga miša. Noradrenalin je imao kraće retencijsko vrijeme (2,17 min) od serotonina (3,7 min), što odgovara i redoslijedu dobivenom u metodi razvijenoj u ovom radu, kao i onome koji su odredili Komura i Sakamoto (1990) pri sličnim kromatografskim uvjetima. Budući da i katekolamini i serotonin u strukturi imaju prsten s vezanom amino skupinom, na njihovo retencijsko vrijeme primarno je utjecao broj hidroksilnih skupina u strukturi - noradrenalin je sa svoje tri hidroksilne skupine najpolarniji od analiziranih spojeva, pa je stoga i prvi eluiran, dok za njim slijede dopamin s dvije, te serotonin s jednom hidroksilnom skupinom. Za razliku od metode koju su koristili Thomas i sur. (2015), izokratan način elucije u ovom radu nije pokazao zadovoljavajuće razdvajanje pikova, što je uobičajena posljedica korištenja različitih kolona. Udio organske faze od 10% u izokratnoj metodi pokazao se prejakim za fino razdvajanje traženih analita, a gradijentan način elucije s postepenom promjenom udjela organske faze s 2 na 12,5% omogućio je spojevima da postepeno eluiraju ovisno o njihovom polarnom karakteru. Prvi korak gradijenta omogućio je dobro razdvajanje noradrenalina i dopamina od brojnih pikova polarnih spojeva u uzorku mozga. Retencijsko vrijeme serotonina nalazilo se na samoj granici dvaju gradijentnih koraka različitih nagiba, stoga je smanjenje udjela acetonitrila s 15% u početnoj gradijentnoj metodi na 12,5% u odabranoj metodi primarno osiguralo bolje razdvajanje pikova koji slijede iza serotonina produživanjem njihovog retencijskog vremena.

Za validaciju metode testirani su selektivnost, linearnost i ponovljivost unutar istog te između različitih dana. Dobro razlučeni i simetrični pikovi svih triju analita ukazuju na dobru selektivnost metode. Linearnost i ponovljivost metode unutar istog te između različitih dana

pokazale su se dobrima za serotonin, no kod dopamina su bile lošije. Budući da je ponovljivost metode bila dobra za serotonin, može se zaključiti da slaba ponovljivost kod dopamina nije odraz mana odabrane metode, već je mogući uzrok tomu raspadanje dopamina. Poznato je da su katekolamini zbog benzenskog prstena u svojoj strukturi osjetljivi na oksidaciju (Sánchez-Rivera i sur., 2003). Na oksidativnu degradaciju dopamina moglo je utjecati vrijeme koje je prošlo između stavljanja uzorka u automatski uzorkovač i čekanja na injektiranje u kolonu pri čemu je moglo doći do raspada dopamina. Moguće je da koncentracije antioksidacijskih komponenata - natrijeva bisulfita i EDTA - u deproteinizacijskoj otopini nisu bile dovoljne kako bi dopamin zaštitile od oksidativne degradacije uzrokovane otopljenim kisikom. Jedan od često korištenih antioksidansa u pripremi bioloških uzoraka je i askorbinska kiselina, a Thorre i sur. (1997) opisali su antioksidacijsku otopinu s dodanim askorbatom i L-cisteinom u kojoj su indolamini i katekolamini bili stabilni tijekom 20 sati. Askorbinska kiselina testirana je u izradi ovog rada u pripremi standardnih otopina serotonina, dopamina i noradrenalina, no pokazivala je pik koji je bilo teško razdvojiti od dopamina, te stoga nije uključena u daljnju pripremu standarda (rezultati nisu prikazani).

Na kromatogramima svježe pripremljenih standarda (Rezultati 4.3., Slika 18) te uzorka mozga s dodanim vanjskim standardom dopamina (Rezultati 4.4., Slika 22) uočljiva su dva manja pika koji se preklapaju s pikom dopamina, a moguće je da pripadaju njegovim oksidacijskim produktima. S druge strane, manji pikovi oko pika dopamina mogu biti i rezultat njegovih različito protoniranih specija. Naime, katekolamini su slabe baze (Nicholls i Ferguson, 1992), a slabe baze često pokazuju višestruke i nesimetrične pikove kada se eluiraju u mobilnoj fazi bez prikladnog pufera (Wiltshire i Nedderman, 2008) – u slučaju razdvajanja spojeva s amino skupinom kao što su serotonin i katekolamini, korištenje amonijevih iona spriječilo bi pojavu višestrukih pikova.

Noradrenalin je u odnosu na dopamin pokazao bolju linearnost. Ipak, zbog njegove sličnosti u strukturi s dopaminom čudi da noradrenalin nije pokazao istu sklonost degradaciji kao i dopamin. Na kromatogramu uzorka tkiva mozga (Rezultati 4.3., Slika 19) nisu vidljiva spomenuta dva manja pika koja okružuju pik dopamina u smjesi standarda, stoga se može zaključiti da je problem uzrokovan standardom dopamina, odnosno, da isti kromatografski uvjeti nisu utjecali na raspad dopamina u uzorku tkiva mozga. Korišteni standard dopamina nije imao

čistoću namijenjenu za analizu na HPLC-u pa bi pokrajnji pikovi mogli odgovarati i nečistoćama ili enantiomernim oblicima. Moguće je da je prilikom pripreme standarda učinjena pogreška u odabiru otapala koja je kasnije utjecala na podložnost oksidativnoj razgradnji dopamina ili pojavi različito protoniranih specija. Stoga bi u budućnosti trebalo koristiti standarde čistoće namijenjene analizi na HPLC-u i ispitati koja otapala i pri kojem pH daju najbolji izgled pikova dopamina.

Razine serotoninina određene metodom HPLC u ovom radu donekle su usporedive s onima koje su Hranilović i sur. (2011) dobili određivanjem razina serotoninina u kori mozga Wistar štakora pomoću metode HPLC s elektrokemijskom detekcijom. U tom istraživanju, koncentracije serotoninina u kori mozga iznosile su prosječno 346 ± 32.4 ng/g - za usporedbu, prosječne koncentracije u ovom radu su $426 \pm 45,95$ ng/g. Razine dopamina i noradrenalina u kori mozga nisu prethodno određivane u istraživanju perinatalno povišenih koncentracija serotoninina, stoga će ovdje dobiveni rezultati u budućnosti poslužiti za usporedbu.

5.2. Usporedba metoda HPLC i ELISA

Rezultati za serotonin dobiveni metodom ELISA značajno su manji od onih određenih metodom HPLC. Serotonin je podložan raspadu fotoionizacijom (Shear i sur., 1997) pa postoji mogućnost da se dio serotoninina raspao tijekom izvođenja metode ELISA na svjetlosti, dok kod HPLC-a to nije bio problem zbog čuvanja pripremljenog uzorka u vijalici tamnog stakla. U metodi ELISA, primarno antitijelo je visoke specifičnosti na acilirani serotonin, pa nije došlo do njegovog vezanja na raspadne produkte serotoninina, a rezultat je bila manja očitana koncentracija serotoninina. Mana kompetitivne metode ELISA svakako leži u tome što se analit kvantificira indirektno. Iako su u izvođenju metode ELISA slijeđene upute proizvođača kompleta, moguće je da je manja greška u izvođenju nekog koraka kasnije amplificirana pri matematičkim konverzijama te time rezultirala krivim određivanjem koncentracije. Primjerice, reakcija peroksidaze ubrzana je na povišenoj temperaturi, a povećana koncentracija njenog produkta daje krivi zaključak o početnim koncentracijama analita u uzorku - budući da se na mikročitaču mjerenjem apsorbancije produkta zapravo mjeri količina antigena vezanog za mikrotitarsku pločicu na koje se vezalo primarno antitijelo, dobiva se dojam da je koncentracija analita bila

manja no što uistinu jest. Sličan efekt na rezultat imalo bi i predugo vrijeme inkubacije sa supstratom peroksidaze.

Razlika u manjim koncentracijama dopamina određenima metodom ELISA u odnosu na one određene metodom HPLC potencijalno leži u koraku ekstrakcije u metodi ELISA. Naime, povoljni uvjeti za ekstrakciju traže pH između 7-8, a uzorci su bili homogenizirani u kiseloj deproteinizacijskoj smjesi. Fenolna struktura dopamina i noradrenalina podložna je oksidaciji pod utjecajem svjetla ili otopljenog kisika, a s porastom pH raste mogućnost formiranja oksidiranog oblika (Kim i sur., 2008), stoga je za pripremu uzoraka i standarda odabran kiseli pH kako bi se spriječila njihova degradacija. Također, za određivanje katekolamina metodom ELISA ne preporuča se korištenje perklorne kiseline u pripremi uzoraka zbog njenog negativnog utjecaja na korak ekstrakcije. Perklorna kiselina standardno se koristi u svrhu deproteinizacije prilikom pripreme uzoraka za HPLC (Dhir i Kulkarni, 2007; Su i sur., 2009; Parrot i sur., 2011), a odstranjivanje makromolekula osobito je važno kako ne bi agregacijom u koloni onemogućile protok mobilne faze. Iako je koncentracija perklorne kiseline u deproteinizacijskoj otopini bila niska, treba uzeti u obzir da je mogla narušiti korak ekstrakcije katekolamina u metodi ELISA, što je kasnije uzrokovalo manju očitanu koncentraciju dopamina. Pretpostavka je ipak da bi isti razlozi utjecali kasnije i na koncentracije noradrenalina, budući da se ekstrahira zajedno s dopaminom, ali to nije bio slučaj - štoviše, koncentracije noradrenalina određene metodom ELISA veće su od onih određenih metodom HPLC. Kako je ranije spomenuto da slabe baze mogu pokazivati višestruke pikove, moguće je da je dio noradrenalina bio prisutan u obliku protonirane specije koja se na kromatogramu uzorka tkiva mozga vidjela kao zasebni pik i time nije pridonijela određivanju ukupne koncentracije noradrenalina.

Iako su ovdje ponuđena neka moguća rješenja razlike u razinama serotonina, dopamina i noradrenalina određenih metodama HPLC i ELISA, ona ne objašnjavaju nedostatak korelacije između rezultata dobivenih ovim dvjema metodama. Unatoč tim razlikama, dobiveni rezultati ukazuju na potencijal razvijene metode HPLC u određivanju razina serotonina, dopamina i noradrenalina u uzorku tkiva mozga. U nastavku razvoja metode potrebno je za početak ispitati kvalitetu pripreme uzorka te ustanoviti u kojim koracima potencijalno dolazi do raspadanja ili gubitka analita - korištenje unutarnjeg standarda u kalibraciji pomoglo bi u pronalaženju tih

odgovora. Također, bilo bi vrijedno ispitati i utjecaj pH mobilne faze na razdvajanje ovih spojeva, kako je to jedan od ključnih faktora koji utječu na razdvajanje u kromatografskoj koloni.

6. Zaključak

1. Razvijena metoda HPLC s gradijentnom separacijom u dva koraka uspješno je razdvojila pikove serotonina, dopamina i noradrenalina u uzorku tkiva mozga štakora.
2. Metoda je validirana određivanjem selektivnosti, linearnosti i ponovljivosti. Metoda je selektivna za sve tražene analite. Dobra linearnost i ponovljivost rezultata za serotonin ukazuju na uspješno razvijenu metodu. Nešto lošija linearnost i ponovljivost metode za dopamin i noradrenalin posljedica su oksidacijske degradacije, postojanja različito protoniranih specija ili nečistoća u kupljenim standardima.
3. Nedostatak korelacije u rezultatima određenima metodama HPLC i ELISA može se pripisati degradaciji analita, te stoga upućuje na daljnji razvoj protokola za pripremu i pohranu uzorka.

7. Literatura

Bakes D (2008). HPLC optimization. U: Venn RF (ur.) Principles and Practice of Bioanalysis. CRC Press, Boca Raton, Florida, Sjedinjene Američke Države, str. 69-99.

Beitz JM (2014). Parkinson's disease: a review. *Front Biosci* 65–74.

Benes FM, Taylor JB, Cunningham MC (2000). Convergence and Plasticity of Monoaminergic Systems in the Medial Prefrontal Cortex during the Postnatal Period: Implications for the Development of Psychopathology. *Cereb Cortex* **10**: 1014–1027.

Berger M, Gray JA, Roth BL (2009). The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* **60**: 355–366.

Blažević S, Dolenec P, Hranilović D (2011). Physiological consequences of perinatal treatment of rats with 5-hydroxytryptophan. *Period Biol* **113**: 81–86.

Blažević S, Čolić L, Čulig L, Hranilović D (2012). Anxiety-like behavior and cognitive flexibility in adult rats perinatally exposed to increased serotonin concentrations. *Behav Brain Res* **230**: 175-181.

Danaher M, Keeffe O, Glennon JD (2000). Validation and robustness testing of a HPLC method for the determination of avermectins and moxidectin in animal liver samples using an alumina column clean-up. *Analyst* **18**: 1741–1744.

Dhir A, Kulkarni SK (2007). Involvement of nitric oxide NO signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol* **568**: 177–185.

Gray A, Lawrence P (2008). Basic HPLC Theory and Practice. U: Venn RF (ur.) Principles and Practice of Bioanalysis. CRC Press, Boca Raton, Florida, str. 41-69.

He H, Stein CM, Christman B, Wood AJJ (1997). Determination of catecholamines in sheep plasma by high- performance liquid chromatography with electrochemical detection: comparison of deoxyepinephrine and 3,4-dihydroxybenzylamine as internal standard. *Journal of Chromatography B* **701**: 21–24.

Hensler JG (2006). Serotonin. U: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL (ur.) Basic Neurochemistry. Elsevier Academic Press, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 227-249.

Hranilović D, Bujas-Petković Z, Vragović R, Vuk T, Hock K, Jernej B (2007). Hyperserotonemia in adults with autistic disorder. *J Autism Dev Disord* **37**: 1934–1940.

Hranilović D, Blažević S, Ivica N, Čičin-Šain L, Orešković D (2011). The effects of the perinatal treatment with 5-hydroxytryptophan or tranlycypromine on the peripheral and central serotonin homeostasis in adult rats. *Neurochem Int* **59**: 202–207.

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006). Neural Mechanisms of Addiction: The Role of

Reward-Related Learning and Memory. *Annu Rev Neurosci* **29**: 565–598.

Jong WHA De, Wilkens MHLI, Vries EGE De, Kema IP (2010). Automated mass spectrometric analysis of urinary and plasma serotonin. *Anal Bioanal Chem* **396**: 2609–2616.

Kema IP, Vries EGE De, Muskiet FAJ (2000). Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **747**: 33–48.

Kim J, Jeon M, Paeng KJ, Paeng IR (2008). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of catecholamine, dopamine in serum. *Anal Chim Acta* **619**: 87–93.

Kolb B, Whishaw IQ (2006). How Does the Nervous System Function? U: Kolb B, Whishaw IQ (ur.) An Introduction to Brain and Behavior. Worth Publishers, New York, Sjedinjene Američke Države, str. 31-69.

Kromidas S (2006). Principles of the Optimization of HPLC Illustrated by RP-Chromatography. U: Kromidas S (ur.) HPLC made to Measure. Wiley VCH Verlag, Weinheim, Njemačka, str. 3-149.

Kuhar JM, Minneman K, Muly EC (2006). Catecholamines. U: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL (ur.) Basic Neurochemistry. Elsevier Academic Press, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 211-226.

Kuss HJ (2006). Optimization of the Evaluation in Chromatography. U: Kromidas S (ur.) HPLC made to Measure. Wiley VCH Verlag, Weinheim, Njemačka, str.105-115.

Leonard BE (2001). Stress, norepinephrine and depression. *J Psychiatry Neurosci* **26**: 11–16.

Liang T, Huang Y, Zhu K (1998). Determination of serotonin in rat brain by gas chromatography/mass spectrometry. *Se Pu* **16**: 271-273.

Lucki I (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* **44**: 151–162.

Lunte SM, O'Shea TJ (1994). Pharmaceutical and biomedical applications of capillary electrophoresis/electrochemistry. *Electrophoresis* **15**: 79-86.

Meiser J, Weindl D, Hiller K (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal* **11**: 34-52.

Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM (2008). Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther* **31**: 187–199.

Moriarty M, Lee A, O'Connell B, Kelleher A, Keeley H, Furey A (2011). Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic disorder. *Anal Bioanal Chem* **401**: 2481–2493.

Myöhänen TT, Schendzielorz N, Männistö PT (2010). Distribution of catechol-O-methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice. *J Neurochem* **113**: 1632–1643.

Nichkova MI, Huisman H, Wynveen PM, Marc DT, Olson KL, Kellermann GH (2012). Evaluation of a novel ELISA for serotonin: Urinary serotonin as a potential biomarker for depression. *Anal Bioanal Chem* **402**: 1593–1600.

Nichols DG, Ferguson SJ (1992). Endpoints. U: Nichols DG, Ferguson SJ (ur.) Bioenergetics 2. Academic Press Inc, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 235-239.

O'Neill RD (1995). Long-Term Monitoring of Brain Dopamine Metabolism In Vivo with Carbon Paste Electrodes. *Sensors* **5**: 317–342.

Palus K, Chrobok Ł, Lewandowski MH (2013). Depolarization of the intergeniculate leaflet neurons by serotonin - in vitro study. *J Physiol Pharmacol* **64**: 773–778.

Parrot S, Neuzeret P-C, Denoroy L. (2011). A rapid and sensitive method for analysis of brain monoamine neurotransmitters using ultra-fast liquid chromatography coupled to electrochemical detection. *J Chromatogr B* **879**: 3871–3878.

Rolls ET, Loh M, Deco G, Winterer G (2008). Computational models of schizophrenia and dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Nat Rev Neurosci* **9**: 696–709.

Sánchez-Rivera AE, Corona-Avendaño S, Alarcón-Angeles G, Rojas-Hernández A, Ramírez-Silva MT, Romero-Romo MA (2003). Spectrophotometric study on the stability of dopamine and the determination of its acidity constants. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* **59**: 3193–3203.

Saunders KC, Venn RF (2008). HPLC detectors. U: Venn RF (ur.) Principles and Practice of Bioanalysis. CRC Press, Boca Raton, Florida, Sjedinjene Američke Države, str. 99-123.

Sanaye M, Joglekar CS (2015). Estimation of bioamines in homogenate using HPLC-UV method. *IJBPS* **4**:17-23.

Shear JB, Xu C, Webb WW (1997). Multiphoton-excited visible emission by serotonin solutions. *Photochem Photobiol* **65**: 931–936.

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (1996). Liquid Chromatography. U: Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (ur.) Principles of Elemental Analysis. Thomson Brooks/Cole, Belmont, Sjedinjene Američke Države, str. 816-856.

Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL (1997). The Column. U: Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL (ur.) Practical HPLC Method Development. John Wiley & Sons Inc, Hoboken NJ, Sjedinjene Američke Države, str. 174-233.

Su F, Wang F, Zhu R, Li H. (2009). Determination of 5-hydroxytryptamine, norepinephrine, dopamine and their metabolites in rat brain tissue by LC-ESI-MS-MS. *Chromatographia* **69**: 207–213.

Sulzer D, Bogulavsky J, Larsen KE, Behr G, Karatekin E, Kleinman MH (2000). Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11869–11874.

Tekes K (2008). HPLC determination of serotonin and its metabolites from human platelet-rich plasma; shift to 5-hydroxytryptophol formation following alcohol consumption. *J Chromatogr Sci* **46**: 169–173.

Thomas J, Khanam R, Vohora D (2015). A validated HPLC-UV method and optimization of sample preparation technique for norepinephrine and serotonin in mouse brain. *Pharm Biol* **53**: 1539-1544.

Thorré K, Pravda M, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y (1997). New antioxidant mixture for long term stability of serotonin, dopamine and their metabolites in automated microbore liquid chromatography with dual electrochemical detection. *J Chromatogr B* **694**: 297-303.

Twarog BM, Page IH (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* **175**: 157–161.

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M (2003). Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Neuroscience* **299**: 76.

Whitaker-Azmitia PM (1999). The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology* **21**: 2S–8S.

Whitaker-Azmitia PM (2001). Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Res Bull* **56**: 479–485.

Whitaker-Azmitia PM (2005). Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: A role in autism? *Int J Dev Neurosci* **23**: 75–83.

Wiltshire H, Nedderman A (2008). Physicochemical Properties of Drugs and Metabolites and Their Impact on Bioanalysis. U: Principles and Practice of Bioanalysis. Ed. R. F. Venn, CRC Press, Boca Raton, Florida, Sjedinjene Američke Države, str. 1-19.

Wise RA (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* **5**: 1-12.

Wu X, Wang R, Jiang Q, Wang S, Yao Y, Shao L (2014). Determination of amino acid neurotransmitters in rat hippocampi by HPLC-UV using NBD-F as a derivative. *Biomed Chromatogr* **28**: 459–462.

Yoshitake T, Yoshitake S, Fujino K, Nohta H, Yamaguchi M, Kehr J (2004). High-sensitive liquid chromatographic method for determination of neuronal release of serotonin, noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci Methods* **140**: 163–168.

8. Životopis

Osobni podaci:

Ime i prezime: Dora Peršić
Datum i mjesto rođenja: 03.09.1992., Varaždin
Adresa prebivališta: B. Radić 28, 42000 Varaždin
Broj mobitela: +385997102676
e-mail adresa: dora.persic@gmail.com

Završeno obrazovanje:

rujan 2011. – rujan 2014. Preddiplomski studij molekularne biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
rujan 2007. – lipanj 2011. Prva gimnazija Varaždin

Stručne prakse:

listopad 2016. – prosinac 2016. Manipuliranje omjera signala i šuma u animalnim modelima shizofrenije i opsesivno-kompulzivnog poremećaja. Laboratorij za neurofiziologiju pamćenja, Institut za fiziologiju, Češka akademija znanosti. Prag, Češka Republika.
rujan 2015. – listopad 2015. Određivanje antimitagenog potencijala lokalne flore roda *Limonium*. Kazaško Nacionalno Sveučilište Al-Farabi. Almati, Kazahstan.

Publikacije:

Blažević S, Merkler M, Peršić D, Hranilović D (2017) Chronic postnatal monoamine oxidase inhibition affects affiliative behavior in rat pups.
Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 153, 60-68.
Blažević S, Peršić D, Hranilović D (2015) Molecular background and physiological consequences of altered peripheral 5-HT homeostasis in adult rats perinatally treated with tranylcypromine.
Molecules of Life, Slovenian Biochemical Society, 243.